

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Niveles y heterogeneidad de calcitonina en procesos
neoplásicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Amparo Pérez Gutiérrez

Madrid, 2015

TA 1854

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
FACULTAD DE MEDICINA.

Memoria que para optar al grado de Doctor en Medicina
presenta Dña. Amparo Pérez Gutiérrez.

"NIVELES Y HETEROGENEIDAD DE CALCITONINA
EN PROCESOS NEOFORMATIVOS".

Director: Prof. J. Tamarit.

Madrid, Septiembre de 1978.



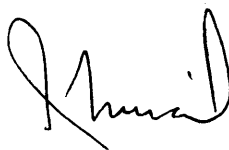
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310593680

D. JORGE TAMARIT TORRES, CATEDRATICO
DE FISIOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

HACE CONSTAR: Que el trabajo "Niveles
y Heterogeneidad de Calcitonina en Procesos Neo-
formativos" , realizado bajo mi dirección por
Dña. AMPARO PEREZ GUTIERREZ, reúne las condiciones
necesarias para ser considerado como Tesis Doctoral.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Tamarit', is positioned below the text. The signature is fluid and cursive, with a large initial 'J' and a final flourish.

Madrid, 20 de Septiembre de 1978.

A mi hijo.

Agradecimientos.

Ya hace más de cuatro años que inicié mi modesta andadura por el camino de la investigación y al recordar con agrado y algo de nostalgia los lugares, personas y circunstancias que me ayudaron en mi trabajo cumplo con un deber elemental de justicia. Paso por tanto a expresar mi agradecimiento y recuerdo a cada uno de ellos.

Al Prof. Tamarit que con su confianza y consejo aceptó la dirección del trabajo y me facilitó los medios necesarios para llevarlo a cabo.

A R. Goberna y J. Tamarit Rodríguez por sus orientaciones en el radioinmunoensayo.

A F. Moya, A. Pellicer y A. Nieto del Instituto Gregorio Marañón del C.S.I.C por iniciarme en el mundo básico del laboratorio y específicamente en las técnicas cromatográficas.

A J.A. Ramos y A. Montes por sus consejos en las técnicas de disociación de agregados de proteínas.

A los Drs. Margarit y Ubiera de los laboratorios Ciba-Geigy por facilitarme el standard de Calcitonina sintética.

Al Prof. Espinós por su colaboración e interés.

A todos los compañeros del Hospital Clínico de San Carlos y de otros Hospitales de Madrid por facilitarme el acceso a un buen número de pacientes.

A todos y cada uno de estos pacientes debo expresar mi profundo respeto y mi más sincero agradecimiento.

Finalmente manifiesto mi reconocimiento a la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense, al Hospital Clínico de San Carlos, al Instituto de Medicina Experimental y al C.S.I.C por permitirme

el acceso a sus Bibliotecas y ayudarme a conocer
las bases de la investigación y a adentrarme humilde-
mente en ella.

Madrid, Septiembre de 1978

I. INTRODUCCION.

I. Introducción.

I.a. CALCITONINA.

I.a.1. DESCUBRIMIENTO.

Si la sospecha de que las paratiroides podían producir una sustancia relacionada con la homeostasis cálcica fué ya apuntada en 1909 por McCallum y Voegtlin,(251), sospecha que se confirmaría en 1925 por Collip (87),hay que esperar hasta 1961 para que sea publicada la primera sugerencia de una segunda sustancia con influencia directa sobre el metabolismo del calcio. Copp y cols. publican sucesivamente dos artículos (93, 94) , comunicando la liberación por las glándulas paratiroides del perro de una sustancia con acción hipocalcemiante. Encontraban que la perfusión del conjunto tiroides y paratiroides con sangre hipercálcica (12mg%) se seguía de una significativa caída en la calcemia; además, si extirpaban las paratiroides y suspendían la infusión de calcio la calcemia se elevaba bruscamente con lo que parecía anularse un hipotético factor hipocalcemiante que, lógicamente, debía originarse en las paratiroides. En un experimento posterior, en 1964, (95), observaban que la perfusión de las glándulas paratiroides de ovejas con sangre hipercálcica se acompañaba de una significativa disminución de la calcemia, hecho que no hallaban cuando era el tiroides la glándula perfundida. Copp y cols. denominaron a tal sustancia con influencia sobre el "tono" del calcio Calcitonina.

Sin embargo había experimentos en contra de este presunto origen paratiroideo de un factor hipocalcemiante. Hirsch y cols,(195), habían comunicado su observación de que la exéresis de las paratiroides de rata por electrocauterio causaba una mayor reducción en la calcemia que cuando la paratiroidectomía se realizaba quirúrgicamente, quizá porque el tiroides al ser traumatizado por el

primer método segregaba una sustancia de acción hipocalcemiante.

Foster y cols,(131), acabaron con esta controversia sobre el lugar de origen de la Calcitonina. Sabiendo que en las cabras las glándulas paratiroides se encuentran perfectamente independizadas pudieron perfundir las aisladamente con sangre hipercálcica, y observaron que tal perfusión no causaba un descenso en la calcemia. Pero si incluían el tiroides en la perfusión sí se producía tal descenso en la calcemia. Finalizaban su comunicación a Nature,(132),afirmando que la Calcitonina (CT) era elaborada por el tiroides ante situaciones de hipercalcemia, y que Calcitonina (CT) y Tirocalcitonina (TCT) son en mamíferos la misma sustancia.

Años después, en 1971, Parsons y cols justificaban la hipótesis equivocada de Copp al demostrar que la Parathormona (PTH) posee un precoz y transitorio efecto favorecedor de la entrada de calcio en la célula con una secundaria y efímera hipocalcemia,(296).

I.a.2. ORIGEN Y EMBRIOLOGIA DE LAS CELULAS PRODUCTORAS DE CALCITONINA.

La presencia en el tiroides de los mamíferos de dos estirpes celulares ya fué observada por Baber en 1876,(27). José F. Nonidez en 1932,(279,280,²⁸¹) confirmó la existencia en el tiroides del perro de unas células distintas a las del epitelio folicular; describió su carácter argirófilo y, por su disposición próxima a las células foliculares, las denominó células parafoliculares. Poco después, Godwin,(151), sugiere que estas c.parafoliculares son similares a las de las glándulas ultimobranquiales, glándulas que aparecen dentro de la escala filogenética en los peces,(165), y permanecen a lo largo de ella (en anfibios, reptiles y aves) como elementos independientes en el territorio de la última bolsa branquial,(97). Es curioso que

se haya demostrado su presencia en todos los vertebrados excepto en los peces ciclóstomos,(99).

Independientemente de las características histológicas y embriológicas de estas glándulas ultimobranquiales, les confiere un rasgo peculiar su rico contenido en Calcitonina, como ha sido probado en distintos eslabones animales,(97 , 98 , 276, 320).

En la caracterización de las c.parafo^liculares hay que destacar la labor de Pearse y Carvalheira (298) al demostrar que estas células en el tiroides de la rata son citoquímicamente iguales a las de las glándulas ultimobranquiales; por otro lado Bussolati y Pearse,(63), comprueban por métodos inmunológicos que las c.parafo^liculares del tiroides del cerdo contienen Calcitonina.

Las c.parafo^liculares vistas al microscopio electrónico muestran gránulos densos en su interior, y su contenido enzimático es muy diferente al de las c.fo^liculares. Los gránulos densos se vacían de su contenido cuando el tiroides es perfundido con sangre hipercálcica, (65), a la vez que se produce un incremento de su contenido en fosfatasa ácida,(132).

Antes de referirnos a la procedencia de las c.parafo^liculares nos parece conveniente hacer unas consideraciones embriológicas previas.

Las vísceras que derivarán del aparato gastropulmonar proceden del endoblasto y de la hoja visceral del mesoblasto o esplacnopleura (Orts Llorca.Ref.285). Las vísceras del aparato urogenital y glándulas anejas derivan del mesoblasto, excepto la médula suprarrenal que posee un origen ectodérmico,(285). La glándula tiroⁱdes se encuentra en todos los vertebrados y procede del epitelio del suelo del intestino faríngeo,endodérmico,(31). Las c.parafo^liculares poseen un origen embriológico diferente ya que derivan de la cresta neural y son por tanto ectodérmicas.. Así cuando Le Dourain y Le Lievre trasplantaron fragmentos de cresta neural de embriones de perdiz a embriones

de pollo vieron que se producía una emigración de sus células hacia las glándulas ultimobranquiales del pollo, (224).

Estas c.parafoliculares poseen además otras características que permiten incluirlas en el denominado por Carvalheira y cols.(74) , y Pearse,(299), sistema APUD. Las c. de este sistema poseen la capacidad de producir hormonas polipeptídicas y algunos de sus caracteres han dado nombre al sistema: "Amine content y/o Amine Precursor Uptake and Decarboxilation"; es decir, contienen aminas y/o precursores de tales aminas,(103,362), contienen aminoácido decarboxilasas y esterasas o colinesterasas inespecíficas, (362,408) . presentan metacromasia enmascarada o basofilia, (362), y, finalmente, dan inmunofluorescencia específica. Este sistema APUD ha sido dividido en dos subsistemas distintos; uno comprendería las células productoras de hormonas o polipéptidos, y otro aquellas células productoras de hormonas con estructura no bien conocida aunque todas contienen catecolaminas y 5-OH-Triptamina.

Seguidamente se recogen las células que integran el sistema APUD,(287):

- 1.- C. productoras de ADH en el hipotálamo.
- 2.- C.de la hipófisis productoras de ACTH,STH y MSH.
- 3.- Pinealocitos de la epífisis,(74).
- 4.- C. beta del páncreas productoras de Insulina.
- 5.- C. alfa-1 del páncreas productoras de Gastrina.
- 6.- C. alfa-2 de los islotes de Langerhans pancreáticos productoras de Glucagon.
- 7.- C. argirófilas del estómago productoras de Gastrina.
- 8.- C. enterocromafines del estómago productoras de Gastrina y Secretina.
- 9.- C. argirófilas del intestino productoras de Colecistiquinina y Pancreozimina.
10. C. enterocromafines del intestino productoras de Secretina y Glucagon.

- 11.- C. A y NA de la suprarrenal productoras de Adrenalina y Noradrenalina.
- 12.- C. parafooliculares tiroideas y extratiroideas productoras de Calcitonina.
- 13.- C. del cuerpo carotídeo productoras de Glomina,(225).
- 14.- C. claras del pulmón productoras de Neumoquinina,(288)
- 15.- Melanocito, (301).
- 16.- C. tipo II de Dogiel de los plexos intramurales del tubo digestivo,(288).
- 17.- C. del aparato yuxtaglomerular renal,(289).

Es probable que ésta sea una lista aún inacabada a la que se incorporarán nuevos elementos en el futuro.

Por microscopía electrónica se han hallado un conjunto de caracteres comunes para estas células, (288): a) Poseen vesículas o gránulos de secreción rodeados por una membrana. b) Contienen mitocondrias de matriz densa y ribosomas y polirribosomas muy numerosos. c) El retículo endoplásmico liso es abundante frente a lo escaso del retículo rugoso. d) Poseen un sistema de microtúbulos y microfilamentos.

El concepto de sistema APUD permite entender la asociación de diferentes procesos neoformativos en un mismo individuo a partir de elementos separados físicamente dentro de dicho sistema. Estos APUDomas, que a su vez pueden incluirse en el conjunto de los tumores derivados de la cresta neural o Neurolofomas, serían capaces de elaborar sustancias polipeptídicas, aminas, etc, y una sustancia amiloide polipeptídica (APUD-amiloide) diferente del amiloide inmunológico de Glenner,(287). Si este APUD-amiloide es una secreción de las células tumorales o una sustancia elaborada por los microtúbulos característicos de las células de este sistema, es algo que precisa confirmación, (290).

Antes de que fuera enunciado el concepto de sistema APUD existía la hipótesis de Feyrter,(128), de

un sistema endocrino o paracrino cuyos elementos poseerían un origen embriológico endodérmico, y que, al menos aparentemente, debería estar emparentado con el sistema APUD. Para intentar casar ambas ideas Weichert sostiene un concepto unificado, ya apuntado un par de años antes por Schimke (339), según el cual todas las glándulas endocrinas secretoras de hormonas peptídicas están relacionadas con el sistema nervioso tanto por su influencia sobre el funcionalismo orgánico, como por su desarrollo a partir de una célula madre de origen neuroectodérmico. Partiendo de una idea general como es la de que las funciones corporales son activadas y coordinadas por el sistema nervioso y el sistema endocrino, junto con los siguientes hechos demostrados, Weichert desarrolló su hipótesis. 1º) Células argentafines pueden hallarse a todo lo largo del aparato gastrointestinal junto con glándulas mucosas relacionadas con él, conductos pancreáticos, vías biliares y vesícula biliar, y en el sistema genitourinario. 2º) El páncreas, que deriva de dos yemas desarrolladas en aquella porción del intestino primitivo que originará el duodeno, posee al igual que los conductos pancreáticos un origen endodérmico. Pero en él, junto con esos elementos endodérmicos hay células argentafines como las células productoras de Glucagon y Gastrina, (129, 374), y se han podido hallar tumores pancreáticos elaboradores simultáneamente de Glucagon, Insulina, Secretina y Gastrina, (397, 432), o de Serotonina e Insulina, (399). 3º) Frecuentemente tumores carcinoides derivados del intestino anterior producen no solamente Serotonina, sino también: Glucagon, (53), Gastrina, (405), ACTH, (366), MSH, (223), Histamina, (334), Insulina, (345), catecolaminas, (271), ADH, (127), y diferentes quininas, (256). 4º) No es excepcional la asociación de neoplasias derivadas de glándulas alejadas entre sí. Dentro de la "Múltiple Endocrine Adenomatosis" ha sido descrito un tipo I, (Síndrome de Wermer) compuesto de: tumor pancreático + tumor hipofisario + hiperplasia paratiroidea,

y un tipo II, que a su vez puede adoptar una forma IIa (síndrome de Sipple) compuesta de :Carcinoma Medular Tiroideo + Feocromocitoma + Hiperparatiroidismo, y una forma IIb con Carcinoma Medular Tiroideo +Feocromocitoma + alteración paratiroidea ocasional + otras anomalías asociadas como neuromas mucosos e hiperplasia de nervios corneales,(53). 5°) Ha sido observado en numerosas ocasiones como un tumor aparecido en un órgano determinado es capaz de producir sustancias hormonales cuya fuente normal es un tejido distinto y alejado. Tomando como ejemplo la ACTH, Weichert señala como su elaboración ha sido descrita en tumores tímicos,(178,274), carcinomas bronquiales de c. pequeñas,(83,191), carcinomas pancreáticos anaplásicos,(233), o carcinomas tiroideos,(13). Además, tumores bronquiales especialmente los de la variedad de células pequeñas son capaces de producir prácticamente la totalidad de las hormonas peptídicas, lo que quizá se deba a que el árbol bronquial aparece embriológicamente en medio de las glándulas endocrinas que se desarrollan a partir del tracto digestivo.

Por todo ello Weichert,(406), sostiene la idea de que todos los tejidos endocrinos secretores de péptidos derivan de células endocrinas multipotenciales procedentes a su vez del neuroectodermo.

I.a.3. EXTRACCION,PURIFICACION y CARACTERIZACION DE LA CT.

EXTRACCION:De los métodos descritos en la literatura, solamente uno,el publicado por Bell,(38), aporta detalles suficientes. Mil gramos de tiroides desecados extraídos en acetona son suspendidos en 10 litros de ác. acético 2N, se calientan a 70°C y se agitan durante 60 min. Después de centrifugar y retirar el sobrenadante, el precipitado insoluble se lava con agua y se añade a una disolución de acético en agua (2:1). Extraído en acético el pre-

cipitado se lleva a pH 3 con hidróxido amónico. A continuación, y agitando continuamente, se añaden 800 g de Oxichelulosa (lavada previamente con HCl 0.2N y acético al 10%,v:v). La suspensión de oxichelulosa se agita 16h a 4°C lavándose seguidamente con acético al 10%. La CT es adsorbida por la Oxichelulosa mientras que algunos componentes inactivos se separan por no adsorberse o con el lavado con acético al 10%. Tras retirar los iones cloruro con una resina de intercambio y centrifugación, el sobrenadante que contiene la CT se liofiliza. Bell obtiene con este método preparaciones de Calcitonina de Salmón de 250 U.MRC/mg. Como en el tiroides humano la cantidad de HCT es muy pequeña comparada p.ej. en el tiroides del cerdo, y sin embargo en el carcinoma medular tiroideo la concentración de CT es mucho mayor, es de estos tumores de donde se obtenido CT humana (HCT), tanto por el método de extracción en ácido descrito por Arnaud y Tsao (22), o por el de adsorción en Oxichelulosa.

PURIFICACION: La adsorción por Oxichelulosa, a pesar de permitir la obtención de preparaciones de considerable contenido en CT, no es un método apropiado para conseguir una pureza adecuada. Por ello Brewer y cols. (56), y Keutman y cols. han descrito los siguientes métodos para la purificación de la CT. Brewer y cols. parten de una preparación de CT porcina con una actividad de 15 U.MRC/mg, (0,01mg de CT porcina equivalen a 1 U.MRC): Primero pasan la muestra por una columna de Sephadex G-50 y obtienen así un pico que eluye con un Kd de 0.7 ($Kd = \frac{V_e - V_o}{V_s - V_o}$), y que demostró por bioensayo poseer una actividad específica de 40-90 U.MRC/mg. Después de comprobar por cromatografía en capa fina que dicho pico se componía aún de varias fracciones lo pasan por una columna de Sephadex G-25 superfino obteniendo tres picos. Por bioensayo, cromatografía en capa fina y electroforesis en Gel de Acrilamida observan que el pico mayor que eluye entre los otros dos, corresponde a CT, considerando el resto como péptidos contaminantes. Ese pico

obtenido en Sephadex G-25 lo pasan por una columna de Carboximetilcelulosa eluida inicialmente con un buffer de acetato amónico a pH 6,3 y conductividad de 7,2 miliohmios, y después con un gradiente lineal comprendido entre pH 6,56 y conductividad 11,8 miliohmios, y un pH 7,0 y conductividad de 15,5 miliohmios.

Así consiguen preparaciones de CT porcina de una actividad de 213 ± 17 U.MRC/mg.

Por otra parte, Keutman y cols,(213), parten de una preparación de CT de salmón extraída en ácido con una actividad de 230 U.MRC/mg. La pasan por una columna de Sephadex G-50 fino y obtienen un pico hormonal que eluye con un $K_d=0,6$ y posee una actividad biológica en rata de 1200 U.MRC/mg. Por cromatografía en capa fina y electroforesis en Gel de Acrilamida comprueban que tal pico hormonal no es homogéneo; para purificarlo lo pasan por una columna de Carboximetilcelulosa (Watman CM-52) que eluyen a 4°C con un gradiente lineal de un buffer de acetato amónico desde 0,01M,pH 4,5 y conductividad 0,7 miliohmios a 0,01M,pH 4,5 y conductividad 6,0 miliohmios. Terminado este gradiente pasan 150 ml de acetato amónico pH 6,0 y conductividad 8,0 miliohmios. Para arrastrar los péptidos que aún pudieran quedar en la columna pasan finalmente un buffer acetato amónico 2M,pH 7,5 y conductividad 50 miliohmios. De este modo obtienen dos fracciones en las que se concentra la mayor parte de la actividad biológica. Por cromatografía en capa fina observan que predomina una de las dos fracciones compuesta de un solo polipéptido y cuya homogeneidad confirman por electroforesis en gel de acrilamida. La actividad biológica de esta fracción determinada por bioensayo es de 2700 u.MRC/mg. La otra fracción sometida a estas técnicas demostró ser heterogénea, con un componente de actividad biológica similar a la de la forma predominante de la que se diferencia por ser menos básico y en la sustitución de Metionina por Valina en el aminoácido 8.

CARACTERIZACION BIOQUIMICA.

La naturaleza peptídica de la CT fué demostrada por Baghdiantz,(28) y Tashjian,(385), por proteólisis enzimática. La secuencia de aminoácidos de las CT porcina, bovina, humana, ovina, de salmón y de anguila es comunicada entre 1968 y 1969,(57, 60,273,276,306).

Para identificar los aminoácidos(AA) de la molécula de CT se han utilizado por los diferentes autores las siguientes técnicas,(56, 213):

- 1) Hidrólisis ácida de las preparaciones hirviéndolas con HCl 5,7N durante 24, 48 y 72 h en un desecador en vacío en presencia de Homoarginina y Norleucina con standard internos. ---2) Digestión enzimática con Papaína y Aminopeptidasa M. ---3) Reducción y alquilación por tratamiento con Urea 6M, Mercaptoetanol 0.14M y ácido Yodoacético,(16).
- 4) Oxidación con ácido Perfórmico a 0°C durante 2h en 1 ml de una mezcla de 19 partes de ácido Perfórmico y dos partes de agua oxigenada al 30%, (265).
- 5) Digestión con Tripsina tratada con L-Tosyl-amido-2-fenil-etil-clorometil-cetona,(218).
- 6) Determinación del Nitrógeno orgánico total por el método de Kjeldall en una mezcla de CT purificada, y cálculo del Nitrógeno presente en una muestra de AA pasados por un analizador de AA,(221). ---7) Análisis de carbohidratos que podían permanecer unidos a la CT a pesar de las sucesivas purificaciones con el método del ácido Persulfúrico,(116), y reacción de Anthrona ---8) Cálculo de yodo presente en la molécula de CT. ---9) Análisis de los extremos por medio de la degradación con Fenilisotiocianato,(120).

De esta manera se conoce la estructura peptídica y aminoácida de las diferentes calcitoninas aisladas hasta hoy. Para completar la caracterización se emplea la medida de la densidad óptica, espectro ultravioleta y coeficiente de extinción molar (y por mg) que diferencian las diferentes CT.

<u>Calcitonina</u>	<u>Pm</u>	<u>Coef.Extinción/mg</u>	<u>Coef.Extinción Molar</u>
SALMON	3418	0,45	1500
PORCINA	3604	2,10	7600
BOVINA	3596	2,50	9250

Todas las Calcitoninas se componen de 32 AA con un extremo Prolinamida en posición 32, un grupo Cis-NH₂ en el otro extremo y un puente disulfuro entre los AA 1 y 7. De los 32 AA solo 9 conservan la misma secuencia en las diferentes CT, son los AA 1,3,4,5,6,7,9,28 y 32.

A pesar de distinta secuencia de AA la estructura de la molécula es parecida, motivo por el que quizá se explica la actividad biológica que cualquier tipo de CT posee en los mamíferos en que es probada,(307). También se ha observado un notable paralelismo entre la carga y la posición relativa en la molécula de los residuos hidrófilos e hidrófobos. Resíduos hidrófobos como Tirosina, Fenilalanina y Leucina aparecen a lo largo de la molécula a intervalos semejantes (posiciones 4,9,12,16,19,22). El AA 22 es una Tirosina o una Fenilalanina. Por lo que respecta a la carga los residuos ácidos se localizan en posiciones 15 ó 30 , mientras los básicos son más numerosos.

El número de AA de Tirosina, importante dato si se va a marcar con un isótopo de yodo, es de 3 en la CT bovina (AA 12,19 y 22), 2 en la CT ovina (AA 12 y 19), y uno en las CT porcina y humana (AA 12).

A pesar de que el extremo N-terminal sea casi igual en todas las especies y pudiera pensarse que a él estuviera ligada la actividad biológica, no ocurre así. Sieber y Gutman (349,168) han demostrado que, al menos en la CT porcina, los 32 AA son precisos para conservar la actividad biológica.

Con métodos inmunológicos ha podido demostrarse la similitud en la actividad biológica de las CT humana y de rata, y la identidad de la secuencia de su molécula entre los AA 17 y 32; además en ambas CT sus determinantes antigénicos residen en la región C-terminal (AA

Secuencia de aminoácidos de algunas Calcitoninas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
ANGUILA:	H-Cis-	Ser-	Asn-	Leu-	Ser-	Thr-	Cis-	Val-	Leu-	Gli-	Lis-	Leu-	Ser-	Gln-	Glu-	Leu-
	His-	Lis-	Leu-	Gln-	Thr-	Tyr-	Pro-	Arg-	Thr-	Asp-	Val-	Gli-	Ala-	Gli-	Thr-	Pro.NH
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
SALMON:	H-Cis-	Ser-Asn-	Leu-	Ser-	Thr-	Thr-	Cis-	Val	-	Leu-	Gli-	Lis-	Leu-	Ser-	Gln-	Glu-
	His-	Lis-	Leu-Gln-	Thr-	Tyr-	Tyr-	Pro-	Arg-	Thr-	Asn-	Thr-	Gli-	Ser-	Gli-	Thr-	Pro.NH
OVINA:	H-Cis-	Ser-	Asn-	Leu-	Ser-	Thr-	Cis-	Val-	Leu-	Ser-	Ala-	Tyr-	Trp-	Lis-	Asp-	Leu-
	Asn-	Asn-	Tyr-	His-	Arg-	Tyr-	Ser-	Gli-	Met-	Gli-	Fen-	Gli-	Pro-	Glu-Thr-	Pro-NH	
PORCINA:	H-Cis-	Ser-	Asn-	Leu-	Ser-	Thr-	Cis-	Val	-	Leu-	Ser-	Ala-	Tyr-	Trp-	Arg-	Asn-
	Asn-	Asn-	Fen-	His-	Arg-	Fen-	Ser-	Gli-	Met-	Gli-	Fen-	Gli-	Pro-	Glu-	Thr-	Pro.NH
HUMANA:	H-Cis-	Gli-	Asn-	Leu-	Ser-	Thr-	Cis-	Met-	Leu-	Gli-	Thr-	Tyr-	Thr-	Gln-	Asp-	Fen-
	Asn-	Lis-	Fen-	His-	Thr-	Fen-	Pro-	Gln-	Gln-	Thr-	Ala-	Ile-	Gli-	Val-	Ala-	Pro.NH

I.a.4. RELACION ENTRE ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD BIOLOGICA.

Ya en el punto anterior se citaban trabajos que indicaban la necesidad de la molécula completa de CT para realizar una acción biológica. Sin embargo algunas modificaciones en la molécula pueden alterar tal actividad. Así, se ha observado como en la CT porcina la oxidación del AA 12 (Tir) por Tirosinasa y la nitrofenilación del Triptófano (AA 13) conlleva la inactivación de esta CT, (58). Contrariamente la oxidación de la Metionina (AA 25) no disminuye su actividad. Por este motivo se supone que algunas zonas de la molécula actúan controlando la estructura de la hormona e influyen de forma decisiva en su actividad biológica.

En cuanto a la CT humana (HCT) se ha observado que la sustitución de Valina por Metionina (AA 8) y Tirosina por Fenilalanina (AA 22) da lugar a una HCT cinco veces más potente que la HCT primitiva en su acción hipocalcemiante en la rata, (241, 242). Maier y cols reparan en que en seis de las ocho estructuras de CT conocidas el AA 8 es Valina, siendo las excepciones la HCT y el tipo III de la CT de Salmón (Metionina en AA 8). Para estos autores la presencia de Valina en el lugar 8 conferiría a la CT una mayor afinidad por el lugar de receptor, aunque quizá no sea éste el único factor determinante porque otras CT de mamíferos con Valina en el AA 8 poseen una actividad biológica muy parecida a la de la HCT.

I.a.5. FISIOLOGIA DE LA CALCITONINA.

La CT ha sido considerada desde su descubrimiento como una sustancia hipocalcemiante, o a lo sumo como frenadora de la movilización cálcica del hueso en una acción anti-PTH. Así los primeros trabajos sobre CT que hay en la literatura describían la disminución en la calcemia que se

producía en el animal de experimentación con la inyección de extractos tiroideos,(197), o que la tiroidectomía causa una hipercalcemia más duradera cuando al animal se le causaba una hipercalcemia experimental ,(162). Esta acción reductora de la calcemia se ha visto que es mayor en animales recién nacidos o en periodo de crecimiento, y es más intensa cuando se administra fósforo al animal,(197).

Sin embargo,y como se describe a continuación, la CT no se limita a ser sólo una sustancia hipocalcemiante a través de una actividad a nivel óseo sino que ha podido demostrarse una mayor complejidad en su acción.

Acciones de la CT sobre el Hueso.

Estudios In Vitro:

- a) Cuando se añade CT a cultivos de tejidos óseos de rata se inhibe la acción osteolítica de la PTH,(137).
- b) La administración de CT a cultivos de tejidos óseos de rata causa un incremento en el número de osteoblastos y disminuye el de osteoclastos incluso en presencia de Parathormona.(139).
- c) Tanto las CT de salmón y de pollo como las CT de mamíferos inhiben la reabsorción ósea en cráneos cultivados de ratones,(317), acción que es superior con las primeras.si se compara con la de mamíferos.
- d) El marcaje de la cortical ósea de rata con tetraciclinas ha permitido observar que la CT incrementa tal cortical,(403).

Estudios In Vivo:

- a) La inyección de CT a ratas a las que previamente se administró Ca-45 se sigue de una disminución en la calcemia y en la radiactividad plasmática y urinaria,(207, 401).
- b) Ratas a las que se administra CT muestran una significativa reducción en la hidroxiprolina en orina,(3) , efecto idéntico al observado en clínica al tratar con CT a pacientes con enfermedad ósea de Paget,(24).

- c) Cuando se inyecta i.v. Ca-45 a un animal tal isótopo se mezcla con el calcio plasmático comportándose como él; paulatinamente va disminuyendo en el plasma a medida que se incorpora al hueso y es intercambiado por calcio no marcado, por lo que va descendiendo la radiactividad específica del plasma. Si en este momento de intercambio se inyecta CT hay una disminución del calcio plasmático total pero no en la radiactividad plasmática, de lo que puede deducirse que la CT no altera la velocidad con que el Ca abandona el plasma.

En consecuencia lo que está reducido es la vuelta de calcio al plasma por haber sido inhibida la reabsorción ósea ya que si el calcio plasmático total está disminuido y se mantiene la cantidad de Ca-45 hay una elevación en la radiactividad específica del plasma, (7,207,321).

- d) La CT aumenta el potencial de membrana de los osteoclastos (mientras que la PTH lo disminuye), (253). A pesar de esta acción opuesta a la de la PTH no debe considerarse a la CT como una sustancia anti-PTH, ya que con la administración a un animal tiroparatiroidectomizado de CT y PTH simultáneamente no se modifica la liberación cálcica ni activadora de la Adenil-Ciclasa producidas por la PTH; quizá haya diferentes receptores para ambas, (314).

Acciones de la Calcitonina en el Riñón.

La inyección de CT porcina a ratas causa un significativo aumento en la calciuria y fosfaturia a través de una inhibición en la reabsorción tubular de calcio, (312), y de fósforo, (322). La CT además estimula la eliminación urinaria de Cloro y Sodio tanto en animales, (7), como en personas, (49,180). La SCT posee un mayor efecto natriurético que otros tipos de CT, (411).

La infusión prolongada en personas de CT causa elevación precoz en la natriuria pero se normaliza a

a las 48 horas de iniciada cuando se ha producido una elevación en los niveles de Aldosterona y Renina. Cuando se suspende la infusión de CT se normalizan la natriuria y Aldosterona y Renina,(49).

Tanto a nivel de hueso como de riñón de rata se ha podido demostrar la presencia de receptores de membrana para la CT, mecanismo por el que se activa la Adenil Ciclasa,(248). Esta activación es paralela a las diferentes actividades biológicas de los distintos tipos de CT; así, si la relación entre las actividades de las CT de salmón, cerdo y hombre es de 40:1:0,5, la relación entre las respectivas activaciones de la Adenil-Ciclasa es :20:1:0,5.

En el hombre no han podido demostrarse aún receptores de membrana a nivel renal para la CT(114), quizá por insuficiente sensibilidad de las técnicas utilizadas.

Se ha descrito también un efecto uricosúrico de la CT,(51), efecto que precisa confirmación ya que puede estar en relación con la excreción de sustancias activas osmóticamente.

Finalmente, a nivel renal la CT posee un efecto inhibidor de la formación de 1-25-(OH)₂-D₃ a partir de 25-OH-D₃,(313).

Acciones de la Calcitonina sobre el Estómago.

En cerdos se ha observado que la CT inhibe la secreción de Gastrina que es estimulada por la PTH, (54). En ratas la CT endógena reduce la secreción ácida gástrica probablemente a través de una inhibición en la secreción de Gastrina,(204). Ambos hechos apoyan la observación hecha en 1949 por Watman y Nasset,(404) de que la tiroidectomía (conservando las paratiroides) reduce significativamente el tiempo necesario para provocar la perforación de la úlcera gástrica en cobayas inducida con Histamina. Por otra parte se ha demostrado un aumento en la secreción ácida gástrica en cobayas deficitarios en CT,(32)

En el hombre dosis farmacológicas de CT reducen la secreción de Gastrina,(284) y la infusión i.v

de Calcitonina de Salmón reduce igualmente los niveles de Gastrina el el Zollinger-Ellison,(36). Sizemore y cols. han hallado hipogastrinemia en un paciente con Carcinoma Medular Tiroideo y niveles elevados de CT endógena,(358)

Acciones sobre el Páncreas de la Calcitonina.

La CT reduce la secreción pancreática inhibiendo la acción estimuladora de la infusión de Secretina y Colecistocinina-Pancreozimina,(199). Hotz y cols. sugieren que la CT inhibe la secreción de las células acinares por interferir con las hormonas estimuladoras de tal secreción ya que no tiene influencia sobre los mecanismos colinérgicos. Parece ser que tal acción inhibidora de la CT sobre la secreción enzimática pancreática no está mediada por una deplección en el calcio extracelular del tejido pancreático. Igualmente la CT reduce la secreción enzimática del páncreas inducida mediante la infusión de calcio.

Acción de la CT en Hígado.

Se ha demostrado en ratas que tanto la PTH como la CT no modifican el "pool" de fosfato hepático,(379), pero Meyer y Meyer han descrito un incremento en el contenido hepático en fósforo inorgánico tras la administración de CT y sugieren que la disminución en la fosforemia por la CT se debe precisamente al depósito de fósforo en el hígado,(259).

La CT inhibe la vasodilatación a nivel hepático producida por la PTH,(79), efecto observado con las CT de salmón y porcina pero no con la CT humana sintética.

Por otro lado se ha observado que la hepatectomía parcial causa hipocalcemia e hipofosfatemia significativas, fenómenos que son dependientes de la presencia de la glándula tiroidea,(240). Si se extirpa el tiroides la regeneración hepática (medida por la incorporación de Timidina-H3 al DNA y por conteo de mitosis celulares) se ve notablemente reducida, pero vuelve a niveles normales si se administran pequeñas dosis de CT.

Calcitonina y Metabolismo de la Glucosa.

Investigando una posible acción de la CT en el metabolismo de la glucosa, Blahos y cols. han observado que la administración de CT de salmón por vía i.m. inhibe en personas normales la hipoglucemia secundaria al ayuno. Sin embargo no comprobaron que la CT inhiba significativamente la liberación de Insulina secundaria a la administración de glucosa,(52).

Otros efectos de la CT.

A pesar de haber sido comunicado que la CT inhibe la secreción gástrica y la de gastrina, no hay suficientes evidencias de que la CT actúe a nivel intestinal al menos directamente,(187,198).

La extirpación en ratas del tubo gastrointestinal no modifica los efectos que la CT posee sobre el hueso y el riñón del animal,(9).

La CT no altera la absorción cálcica en asas intestinales aisladas de perro, ni los efectos que la vitamina D3 posee a nivel del duodeno del pollo (síntesis de una proteína específica ligadora de calcio, y elevación del c-AMP y transporte transmucoso de calcio),(102,104).

Metabolización y duración de la acción de la CT.

Estudios in vitro indican que la CT porcina se degrada en gran manera en preparaciones hepáticas mientras que la SCT apenas se degrada allí (111,275), y sí

de manera especial en el riñón,(110,275,337). La HCT se inactiva tanto en hígado como riñón (270). La observación hecha por Tashjian y Munson (383) de que en el suero de ratas, conejos y personas hay un factor termolábil que inactiva la CT se ha visto confirmada por otros autores,(275, 170,171); tal factor debe ser un enzima más activo frente a formas heterólogas de la hormona (171).

La vida media de la HCT es aproximadamente de 15 minutos y la velocidad de catabolismo de la SCT en el hombre es superior a la de la HCT (124 y 92 ml/m² respectivamente) ((18).

Interacciones de la CT con la Corteza Suprarrenal.

La acción hipocalcemiante de la CT no es modificada por la adrenalectomía (258,379)pero ésta sí inhibe los efectos natriurético, diurético y fosfatúrico de la CT ((8)). La adrenalectomía por otra parte no influye sobre el efecto hipercalcémico de la CT endógena en ratas a las que por via intraperitoneal se les inyecta Cl₂Ca (379).

El tratamiento de ratas con dosis altas de Cortisol (100 mg/kg/dia durante 4 días) inhibe la acción hipocalcemiante de la CT (388).

Finalmente ha sido comunicado un efecto protector frente a la osteoporosis causada por dosis elevadas de cortisona de CT porcina inyectada a ratas (389).

Interacciones de la CT con Hormonas Sexuales.

La CT causa menos hipocalcemia en ratas hembras sexualmente maduras que en machos (282). El tratamiento con andrógenos incrementa la acción hipocalcemiante de la CT en machos y hembras de rata gonadectomizados mientras que los estrógenos reducen la respuesta a la CT (364,211).

La CT inhibe la reabsorción ósea en ratones causada por los estrógenos (369).

Interacciones de la CT con otras Hormonas Tiroideas.

El efecto hipocalcemiante de la CT es más intenso en ratas tiroidectomizadas y en ratas tratadas con Tiroxina que en ratas normales (378) aunque es menor si el hipertiroidismo es de larga evolución (80). Las drogas antitiroideas reducen la secreción de CT en cerdos sin modificar la respuesta hipocalcémica a la CT (118).

El contenido de CT en bocios de rata es significativamente más elevado que en el tiroides de ratas normales y el número de células C determinado por el método de inmunoperoxidasas se incrementa en el hipotiroidismo (302).

Interacciones de la CT con Metabolitos de la Vitamina D.

La administración de Calcitonina de Salmón (SCT) a ratas deficitarias en Vit. D a las que se aporta 25-OH-D3 incrementa la conversión de éste a 1-25-(OH)₂-D3 y reduce el paso a 24-25-(OH)₂-D3, (141). Sin embargo, ni la CT ni la PTH son esenciales para la acción de la Vit. D como han demostrado De Luca y Melanson al mantener la calcemia dentro de límites normales en animales tiroparatiroidectomizados administrándoles solamente grandes dosis de Vit.D3, (254).

In vitro la CT inhibe la reabsorción ósea estimulada por el 25-OH-D3, y grandes dosis de Vit.D causan una significativa reducción en el contenido tiroideo de CT en distintos animales (429)!

Relaciones de la Calcitonina con la Hipófisis.

La acción hipocalcemiante de la CT es independiente de la integridad de la Hipófisis (6). Además, el contenido tiroideo de CT no se modifica en las ratas al menos durante las dos primeras semanas después de ser hipofisectomizadas, y en cerdos desciende significativamente a los 27 días de la hipofisectomía, (69, 96).

La vía a través de la que actúa la CT no está aún suficientemente aclarada. Su acción inhibidora de la reabsorción ósea es independiente de la PTH ya que conserva íntegra su actividad en animales paratiroidectomizados, (321, 384). Del mismo modo sus efectos no dependen de la Vit.D al mantenerse su actividad en animales alimentados con una dieta pobre en tal vitamina o muy abundante en ella (266, 363). Tampoco la CT actúa a través de la síntesis de RNA ya que su acción no se modifica tras la administración de Actinomicina D, antibiótico que inhibe la síntesis del RNA dependiente del DNA por formar complejos con el DNA, (384).

Rasmussen en el libro de Endocrinología de Williams (314) propone el siguiente modelo de acción para la CT:

- 1) La CT causa una inicial y rápida liberación de calcio a partir de células óseas.
- 2) Tras esta salida de calcio produce una intensa inhibición en la movilización del calcio óseo.
- 3) Induce la fijación de calcio por células aisladas.
- 4) No modifica, o lo hace muy escasamente, la concentración de C-AMP en tejidos óseos.
- 5) Inhibe la concentración y producción ósea de citrato.
- 6) Aumenta el potencial de membrana de los osteoclastos.

Por otro lado la CT activa una ATP-asa de la membrana de los eritrocitos dependiente de iones Ca^{++} y Mg^{++} , y relacionada con el bombeo de calcio al exterior de dichas células (294).

Otros autores han comprobado que la infusión i.v de SCT a personas normales causa una elevación en los niveles de C-AMP plasmáticos y urinarios. Dado que basalmente la excreción renal de C-AMP es inferior a la cifra total presente en la orina, y cuando se administra SCT tal relación se invierte, puede deducirse que la CT estimula la producción de C-AMP en tejidos extrarrenales y que el exceso de C-AMP formado es catabolizado por los riñones, (19).

A pesar de lo expuesto anteriormente no se poseen aún evidencias suficientes para suponer que la CT actúe únicamente tanto a nivel óseo como renal a través de un receptor de membrana que lleve a estimular la producción de Adenil-Ciclasa y por tanto de C-AMP, (134).

I.a.6. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SECRECIÓN DE CALCITONINA Y PRUEBAS QUE ESTIMULAN SU SECRECIÓN.

CALCIO: Foster en 1964 ya había observado que la perfusión del tiroides con sangre hipercálcica se seguía de una disminución en la calcemia, (134), y Care y cols. demostraron por bioensayo que los niveles de CT se elevaban en la sangre venosa efluyente del tiroides de oveja cuando perfundían tal glándula con sangre hipercálcica, (67, 68).

El contenido en CT del tiroides de rata se reduce significativamente al someterlo a situaciones de hipercalcemia (150); contrariamente si después de practicarse una paratiroidectomía se alimenta a la rata con una dieta pobre en calcio el contenido tiroideo de CT aumenta también significativamente.

Lee y cols. comprueban por RIA una clara relación entre la CT presente en la sangre de conejo y la hipercalcemia inducida por infusión i.v de calcio (150), y en seres humanos han sido descritos resultados similares, (387).

Los trabajos de Radde y cols. han demostrado que el mantenimiento de láminas de tiroides de conejo en medios con alto contenido cálcico se acompaña de un incremento en su contenido de CT (310).

Esta estimulación de la secreción de CT por el tiroides se conserva en el carcinoma medular tiroideo , neoplasia derivada de las células parafoliculares, como se ha observado por numerosos autores (257).

Finalmente, el calcio reduce la dosis de Pentagastrina necesaria para alcanzar un efecto secretor de CT por este péptido, (327).

MAGNESIO: La influencia del Magnesio en la secreción de CT es dudosa ya que aunque hay datos que sostienen una acción semejante a la del calcio, se han obtenido en condiciones no fisiológicas (309). Además otros autores han comprobado que en pacientes con carcinoma medular tiroideo la infusión de Magnesio no eleva los niveles de CT (239).

GLUCAGON: Tanto en seres humanos como en diversos animales se ha observado que el Glucagon puede causar hipocalcemia, (50,292,293,382). Sin embargo como la infusión de Glucagon causa hiperglucemia y aumento secundario de la osmolaridad plasmática con salida posterior de líquido al espacio intra vascular algunos investigadores han apuntado que la hipocalcemia se debe más a la hemodilución que a un efecto hipocalcemiante del Glucagon (257).

GASTRINA: Tanto la Gastrina como la Pentagastrina (penta péptido portador del tetrapéptido carboxiterminal de la Gastrina) estimulan la secreción de CT en pacientes con carcinoma medular tiroideo y en diversos animales (72 , 91 , 181 ,181 ,263). Además, en estudios realizados in vitro se ha comprobado que la Pentagastrina posee una acción sinérgica con el Glucagon 1-27, y que el calcio potencia la estimulación de la secreción de CT inducida por la Pentagastrina.

PANCREOZIMINA: Se trata de un polipéptido de 33 AA cuyo pentapéptido carboxiterminal es idéntico al de la Gastrina y que también posee un efecto estimulador de la secreción de CT (70).

ALCOHOL ETILICO: La ingesta de etanol se ha comprobado estimula la secreción de CT (84 ,263); además también por vía i.v eleva los niveles de CT sin modificar los de Gastrina y de Calcio (407). Por ello puede deducirse que su acción no se realiza a través del calcio ni de la Gastrina.

ESTIMULANTES DEL PARASIMPATICO: Los estimulantes del parasimpático inducen la secreción de CT como también estimulan la secreción de Gastrina, Glucagon y STH (73 , 135, 166, 236).

BLOQUEANTES BETA Y ALFA ADRENERGICOS: La administración de un betabloqueante a la vez que se infunde calcio causa una gran elevación en los niveles de CT. Pero si se infunden paralelamente Glucagon y un betabloqueante no se modifica la CT. Como el Glucagon por sí solo puede estimular la secreción de CT cabe deducir que su acción es mediada por la actividad del C-AMP, influida a su vez por la actividad simpatoadrenérgica (393). Igualmente la infusión de calcio después de un tratamiento con alfabloqueantes provoca una notable elevación de la CT pero inferior a la provocada por un betabloqueo. También los alfabloqueantes inhiben el posible efecto estimulador de la secreción de CT causado por el Glucagon,(257).

FOSFORO: Aunque Franchimont y Heynen habían hallado mediante la infusión de fósforo una elevación en los niveles de CT plasmática con correlación entre CT y fósforo, y apuntaban que éste estimulaba la secreción de CT, Paillard y cols han comunicado que la infusión de fosfato no modifica los niveles de CT ni los de Calcio tanto en personas normales como en pacientes en insuficiencia renal crónica,(136, 291).

AMP-Cíclico: La perfusión con Dibutiril-Cíclico-AMP de tiroides aislados de cerdo aumenta la velocidad de secreción de CT, aumento que es favorecido por un inhibidor de la fosfodiesterasa como es la teofilina,(71).

ESTREPTOMICINA: Este antibiótico bactericida posee un efecto estimulador de la secreción de CT probablemente a través del AMP-C, ya que el imidazol (activador de la fosfodiesterasa) inhibe tal acción (140).

SECRETINA: Estudios in vitro realizados en cultivos de células C de trucha se ha comprobado que la Secretina estimula la secreción de CT (327).

SOMATOSTATINA: En ratas y monos la Somatostatina suprime la secreción in vivo de PTH y CT,(177).

Entre las diferentes sustancias que directa o indirectamente se sabe poseen una acción estimuladora de la secreción de CT se han escogido por casi todos los autores solamente tres como las más idóneas para ello. Se trata de la infusión de calcio (15 mg/kg/4h), la inyección i.v de Penta-gastrina (0,5 ug/kg de peso), y la ingesta de una bebida con alto contenido en etanol (50 ml en ayunas) ,(84,181,182,183 , 263. Sin duda la más cómoda y mejor soportada por el paciente es la tercera aunque la inyección de Pentagastrina es la más segura al elevar los niveles basales de CT aún en los casos en los que las dos otras pruebas no lo consiguieron, 181 , 182, 135).

I.á.7. PAPEL FISIOLÓGICO DE LA CALCITONINA.

Ya que las células productoras de CT se encuentran ya en los peces más inferiores, la acción de la CT activadora del bombeo de calcio al exterior de la célula estaría encaminado a neutralizar hasta cierto punto las altas concentraciones de calcio del agua marina.

La secreción de CT es estimulada por situaciones de hipercalcemia , situaciones que se prolongan más y alcanzan mayor intensidad en animales tiroidectomizados (149). Del mismo modo la hipercalcemia inducida por la vitamina D o la Parathormona es mayor en animales tiroidectomizados. La CT inhibe la reabsorción ósea al aumentar el número de osteoblastos y disminuir el de osteoclastos, pudiendo por tanto decirse que es un polipéptido conservador del hueso y de la sustancia mineral (134,232).

Se desconoce cual es la acción fundamental de la CT en circunstancias fisiológicas ya que ni la tiroidectomía ni el exceso de CT comprobado en pacientes con carcinoma medular tiroideo se acompaña de síntomas,(100).

La CT posee en los mamíferos un efecto natriu-
rético (49,180, 411) pero a dosis muy superiores a las preci-
sas para reducir significativamente la calcemia, por lo que
no se considera aquella como una acción de importancia fisio-
lógica (191).

La CT también favorece la fosfaturia y la eli-
minación de cloro por la orina, acciones que pueden tener
algún significado en animales inferiores pero mucho menor en
mamíferos por la disponibilidad de otros mecanismos regulado-
res de mayor efucacia (7,180, 322).

I.a.8. APLICACIONES DIAGNOSTICAS DE LA DETERMINACION DE CT.

En el Carcinoma Medular Tiroideo , neoplasia
originada a partir de las células parafoliculares tiroideas,
es donde se han encontrado los niveles más elevados de CT
plasmática tanto basal como después de utilizar un estimula-
dor de su secreción ,(181,257). Como esta neoformación tiene
una alta incidencia familiar, su diagnóstico en un individuo
obliga a descartar otros casos en otros miembros de la fami-
lia. La determinación de CT constituye un buen medio diagnós-
tico especialmente si con una prueba de estimulación se en-
cuentran cifras casi exclusivas de este tipo de neoplasia.
Algunos autores (20) han empleado la determinación de CT
en pacientes previamente operados de carcinoma medular tiroi-
deo en sangre obtenida por cateterización de venas que drenan
diferentes territorios para localizar metástasis productoras
de CT.

A pesar de que la CT se ha considerado como
la hormona hipocalcemiante no puede deducirse a partir de una
calcemia la cifra de CT circulante. De hecho en la etiología
de la hipocalcemia no se incluye el hipercalcitoninismo , y
la calcemia puede hallarse dentro de límites normales aún an-
te niveles muy elevados de CT. Parece que en los mamíferos es
la Parathormona la sustancia con mayor importancia en la re-
gulación de la calcemia.

Abundando en lo escrito arriba puede escri-
birse que niveles elevados de CT se han encontrado en patolo-

gías tan diversas como el Hiperparatiroidismo Primario (64 , 136 , Neoplasias bronquiales (261,353), Neoplasias de origen diverso (192,261), Pancreatitis Aguda (66 ,147) e Insuficiencia renal crónica (188,210). En la mayoría de estas patologías no se halla correlación entre calcemia y CT.

Cabe decir por tanto que la principal aplicación diagnóstica de la determinación de CT es el Carcinoma Medular Tiroideo tanto para la detección de casos nuevos como para confirmar recidivas y/o metástasis productoras de CT.

I.a.9. CALCITONINA EN ENFERMEDADES NO TIROIDEAS.

Aunque como se indica en el punto anterior la enfermedad que cursa generalmente con niveles elevados de CT es el Carcinoma Medular Tiroideo, hay otros padecimientos en los que también se puede encontrar hipercalcitoninemia. Así este hecho se ha observado en Pancreatitis Agudas por diferentes autores (66 , 147; 293). Se llegó incluso a postular que la hipocalcemia observada en algunas Pancreatitis Agudas podía ser secundaria a un exceso de CT, pero al no hallarse correlación significativa entre CT y calcemia en estos enfermos tal hipótesis es ya apenas sostenida.

Igualmente en diferentes patologías que cursaron con hipercalcemia tales como neoplasias con metástasis óseas, hiperparatiroidismo primario, mielomas, etc, se han encontrado niveles significativamente elevados de CT (136) Se admite que la hipercalcemia consecutiva a la movilización cálcica sería el estímulo para la secreción de CT en esos casos.

En distintos tipos de tumores no tiroideos especialmente los carcinomas bronquiales indiferenciados de células pequeñas en ausencia de metástasis óseas e hipercalcemia se han hallado también cifras elevadas de CT (4 , 78 ,350 , 353, 354,) . Esto no tiene nada de particular si se tiene en cuenta el amplio conjunto de síndromes endocrinos que se han hallado asociados a este tipo de tumores bronquiales como se describe

en otro apartado más adelante. Este hecho se explica por la similitud histológica existente entre las células claras del epitelio y glándulas de la mucosa bronquial con las células argentafines del tracto gastrointestinal al poseer un origen embriológico común a partir de la cresta neural (ectodérmica) (40, 74, 288, 300).

Se investigaron con especial interés los niveles de CT circulantes en pacientes afectos de enfermedad ósea de Paget, ya que como en su terapéutica se utiliza con cierto éxito la CT podía pensarse que era un defecto de CT el responsable de esta enfermedad. Sin embargo algunos autores han comprobado CT basalmente elevada en estos pacientes en los que además la infusión de calcio se siguió de una significativa elevación de aquella, (136, 413).

En cuanto a la hipercalcitoninemia basal hallada en diversas series de pacientes con insuficiencia renal crónica cabe plantearse si es debida a una hiperproducción o a un defecto en su aclaramiento (17, 136, 188, 219). Se admite que un exceso de CT estaría encaminado a frenar la reabsorción ósea estimulada por un hiperparatiroidismo secundario frecuentemente hallado en estos enfermos ya que en algunas series se halló incluso correlación significativa entre niveles de CT y de PTH, (188).

I.a.10. APLICACIONES TERAPEUTICAS DE LA CALCITONINA.

La CT se ha utilizado en Terapéutica aplicando fundamentalmente su acción inhibidora de la reabsorción ósea; por ello sus indicaciones se cifraron en situaciones de hipercalcemia y de manera especial en enfermedades con un elevado turnover óseo. Así ya en 1966 Foster había conseguido un significativo descenso en la calcemia en pacientes con hipercalcemia secundaria a metástasis óseas múltiples al ser tratados con CT (133). Un resultado semejante se ha descrito en hipercalcemias aparecidas en el seno de : Hiperparatiroidi-

dismo Primario (169,186), Tirototoxicosis (414), Intoxicación por Viatmina D (409), Mieloma (37 , 77), Osteodistrofia Renal (106) e Hipercalcemia Infantil Idiopática (260).

También se ha empleado la CT en el tratamiento de la Osteoporosis con resultados dispares, (85 , 208), llegando algunos autores como Milhaud y cols. a hipotetizar que la osteoporosis posmenopáusica y senil puede estar condicionada por un descenso en la producción de CT con la edad (262).

En cuanto a la enfermedad de Paget su tratamiento con CT ha producido una bibliografía especialmente copiosa. No solamente la CT porcina (39 , 48 ; 84) sino también la CT de salmón ha sido utilizada con resultados a veces alentadores. Así Avramides y cols. (23,25) después de tratar trece casos de enfermedad poliostróica de Paget con CT de salmón llegan a la conclusión de que 50 u.MRC por vía subcutánea en días alternos durante dos años aproximadamente son suficientes para conseguir una mejoría clínica y analítica. En su serie solamente la mitad de los pacientes tratados durante casi dos años presentaron al final del tratamiento niveles detectables de anticuerpos anti CT de Salmón. Más recientemente Epstein y Owen (125) tratan 12 casos de enfermedad de Paget con 1 mg diario de CT humana durante un mes, y un mg en días alternos durante los cinco meses siguientes, observando una clara mejoría clínica y analítica sin efectos locales ni aparición manifiesta de anticuerpos.

Por otra parte hay que señalar una posible aplicación futura de la CT en la prevención y/o tratamiento de la arteriosclerosis. En conejos se ha comprobado como la CT actúa a nivel de las células musculares lisas de la capa media de las grandes arterias ejerciendo una acción protectora frente a las alteraciones bioquímicas y morfológicas secundarias a la arteriosclerosis experimental provocada con la inmunización mediante k-Elastina, (319). Las lesiones arteriales producidas con este procedimiento son anatomopatológicamente

muy parecidas a las observadas en la arteriosclerosis humana (286,318).

Finalmente la CT ha sido empleada con cierto éxito en el tratamiento de la Osteogénesis Imperfecta (75), y en la hipercalcemia de la Crisis Tireotóxica (414).

I.b. METODOS PARA LA DETERMINACION DE CALCITONINA.

I.b.1. BIOENSAYOS.

Los métodos biológicos como los cultivos de tejidos óseos conllevan grandes dificultades técnicas y precisan de un material difícilmente disponible, por lo que la gran mayoría de los ensayos biológicos se realizan "in vivo", (92).

La acción hipocalcemiante de la CT obedece a la inhibición de la reabsorción ósea motivo por el que en los bioensayos in vivo se utilizan preferentemente animales jóvenes (casi siempre ratas) que de por sí tienen un alto turnover óseo, (90).

Desde 1964 se han descrito varios métodos biológicos (196,372). La mayoría miden la hipocalcemia producida en el animal de laboratorio al administrarle por vía parenteral un estándar de CT. A continuación recogemos el método descrito por Cooper y cols. (92):

... Ratas de 4 semanas de 90-100 g de peso son mantenidas con una alimentación estándar hasta 24 horas antes del ensayo en que se las pasa a una dieta pobre en calcio (0,05%) y con un 0,3% de fósforo.

... Tras anestesarlas con éter por vía subcutánea se les administra preparaciones parcialmente purificadas de CT diluidas en acetato sódico al 1/1000 y llevadas a pH 3 con HCl.

... A los 70 minutos de la inyección de cada estándar de CT se extrae por punción cardíaca sangre al animal, determinándose la calcemia en cada una de las sangres extraídas, observándose su relación con las diferentes concentraciones de CT administradas. De esta forma se obtiene una curva estándar que relaciona dosis de CT con su respuesta hipocalcémica.

Con este método puede calcularse la concentración de una muestra determinada al comparar la hipocalcemia por ella producida con una curva estándar previamente

calculada. La máxima sensibilidad alcanzada con los bioensayos no supera las 0,1 mU/ml.

Entre los bioensayos in vitro hay que señalar el método de Parsons y Reynolds (295) basado en la inhibición por la CT de la liberación de Ca-45 causada por la vitamina A, mientras que Raisz y cols. valoran la inhibición por la CT de la liberación de Ca-45 producida por la PTH en cultivos de tejidos óseos de embriones de rata incubados con Ca-45,(311).

I.b.2. RADIOINMUNOANÁLISIS, (RIA).

Los métodos biológicos se emplean casi exclusivamente para la valoración de muestras durante la extracción y purificación de la CT, pero dada su escasa sensibilidad no pueden ser utilizados para medir los niveles basales normales en mamíferos y especialmente en el hombre. Por ello ha sido precisa la aplicación de un método de mayor sensibilidad como es el Radioinmunoanálisis o Radioinmunoensayo cuyos cimientos y principios fundamentaron la Premio Nobel de Medicina de 1977, Rosalyn Yalow y Salomon A. Berson. Estos investigadores habían iniciado en 1953 sus trabajos sobre el comportamiento in vivo de proteínas marcadas con I.131. Estudiando el metabolismo de la Insulina-I.131 en diabéticos observaron que la mayoría de los pacientes tratados con Insulina poseían en sangre circulante anticuerpos frente a ella y que además se ligaban a ella (42). Comprobaron que añadiendo cantidades progresivamente más altas de Insulina in vitro a una dilución determinada de anticuerpo se producía un descenso progresivo de la fracción ligada a la gamma globulina; además se podía obtener un desplazamiento de la Insulina-I.131 ligada a la gamma globulina añadiendo Insulina fría o no marcada. La observación de que la reacción de la Insulina-I.131 con el anticuerpo depende cuantitativamente de la cantidad de Insulina presente cuando la cantidad de anticuerpo permanece constante, y que la Insulina-I.131 puede ser desplazada por

la Insulina fría, constituyeron las bases del RIA. Esta técnica fué rápidamente aplicada a la determinación de CT y ya en 1968 Deftos y cols (107) comunicaron el primer RIA aplicado a CT porcina. Desde entonces numerosos grupos han publicado diferentes métodos con mayor o menor sensibilidad y especificidad.

Seguidamente se recogen las carecterísticas generales de los RIAs de CT.

I.b.2.a. ANTIGENO FRIO.

En un RIA la hormona o péptido que va a ser marcada con un isótopo y empleada como estandard ha de poseer la máxima estabilidad y pureza. Como la CT ha sido sintetizada y se dispone en preparaciones de extraordinaria pureza con una actividad biológica bien estandarizada por la Division of Biological Standards, Medical Research Council, Mill Hill (Londres) tal premisa no constituye ningún obstáculo.

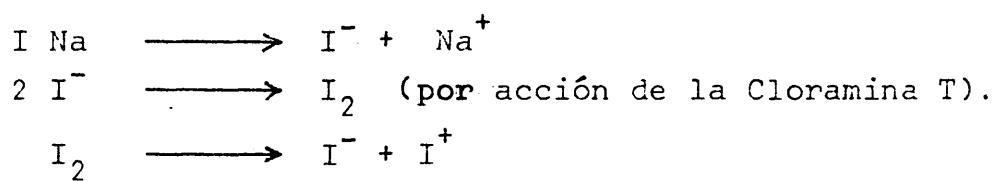
La estabilidad de la proteína o sustancia a medir es igualmente de gran importancia ya que su inestabilidad intrínseca o secundaria a las condiciones de incubación puede modificar significativamente los resultados e impedir su fiabilidad. Es conocida a este respecto la inestabilidad de la CT porcina en presencia de plasma o suero, lo que eleva el % de hormona marcada dañada durante el ensayo y reduce la sensibilidad,(138).

En la práctica totalidad de los RIAs actuales de CT se emplea HCT sintética con una actividad biológica de 114 U.MRC /mg.

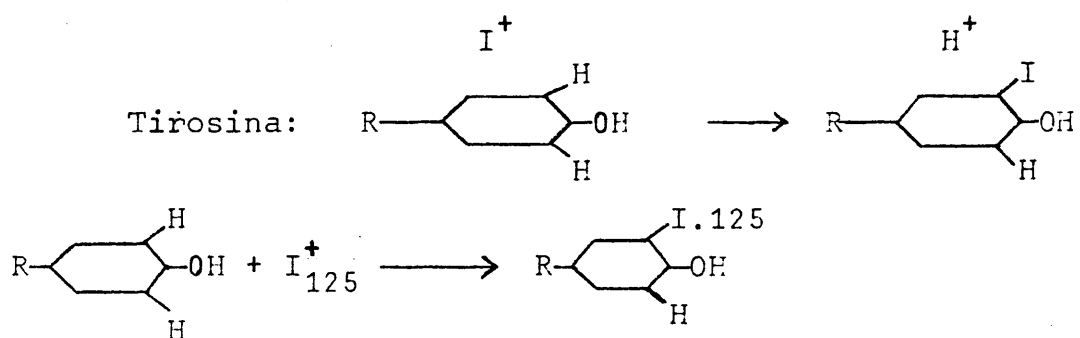
1.b.2.b. ANTIGENO MARCADO.

Hasta que Hunter y Greenwood introducen a partir de 1962 la Cloramina T en el marcaje de proteínas (200), se utilizaba el método del Monocloruro de Iodo de McFarlane (238). Aquellos autores sistematizaron su método basados en que la Cloramina T en un medio acuoso libera ácido hipocloroso, oxidante que favorece la formación de iones I^+ a partir de I_2 ,

ETAPAS DE LA IODACION

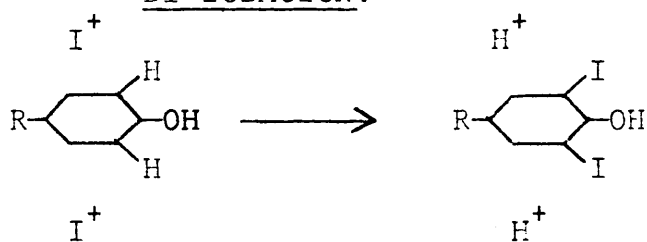


MONOIODACION



El Metabisulfito Sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) reduce al I^+ pasándolo a I^- , y anulando la oferta de I^+ interrumpe la iodación:

DI-IODACION.



iones que pueden incorporarse a los aminoácidos de Tirosina presentes en la molécula de la hormona por una vía de cambio isotópico (41 ,201).

Como el periodo de semidesintegración del I.131 es pequeño (apenas 8 días) es el I-125 el empleado por casi todos los autores al poseer un periodo de semidesintegración de 60 días.

Igualmente hay un consenso general en admitir que la iodación se favorece en un medio alcalino próximo a la neutralidad (126).

La cuantía de los elementos que intervienen en el marcaje (hormona fria,oxidante,isótopo,buffer,y tiempo de reacción) admite escasas variaciones. La cantidad de hormona a marcar oscila entre 1 y 5 μ g en un volumen de 10 a 50 μ l. El isótopo (I.125) se emplea en cantidades de 0,5 a 2 mCi en un volumen de 5-15 μ l, y la Cloramina oscila de 20 a 80 μ g en un volumen de 20 a 100 μ l.

Aunque la Cloramina T mejora el rendimiento del marcaje al aumentar la incorporación isotópica tiene el grave riesgo de degradar la hormona y reducir en gran medida su inmunoreactividad.

Para interrumpir la iodación se utiliza un reductor como el Metabisulfito Sódico que favorece el paso de I^+ a I^- e impide así que se siga incorporando a las Tirosinas de la proteína. Estos agentes reductores al igual que la Cloramina T deben ser utilizados con precaución ya que poseen un cierto poder de desiodación,(41).

Durante el marcaje, que suele realizarse a temperatura ambiente, la hormona no solamente se marca sino que algunas de sus moléculas se rompen o alteran su estructura originando fragmentos o agregados que deben ser separados de la fracción hormonal que será utilizada en el ensayo. Tal fracción "dañada" así como el isótopo no incorporado a la proteína pueden ser retirados con distintos procedimientos que dependen de las características fisicoquímicas de la misma y del isótopo empleado. Los métodos de purificación más comúnmente utilizados son: Cromatoelectroforesis, Filtración en Gel, Precipitación con ác.Tricloroacético, y adsorción por Talco, Celulosa

y sílices en polvo (OUSO).

Con la Cromatoelectroforesis (CEF) en Papel (Watman 3MC ó 3MM para la CT) la hormona marcada y no dañada permanece en el origen mientras que la hormona dañada y el isótopo libre se separan al emigrar hacia el ánodo.

El fundamento de la cromatografía por Filtración en Gel (Sephadex, BioGel, etc) estriba en que las moléculas corren a lo largo de una columna llena de un gel a una velocidad proporcional al diámetro de su molécula a su vez relacionado con su peso molecular. Citamos textualmente a continuación la descripción que del método hace Lehninger en su Bioquímica: " Se permite que una disolución de proteína fluya por gravedad a través de una columna rellena de un material hidrocarbonado polimerizado y de un alto grado de hidratación, que puede emplearse con diferentes tamaños de partículas. Tal tipo de columna puede clasificar las moléculas esféricas según su medida, ya que las proteínas o sustancias de diferentes tamaños diferirán en su capacidad para penetrar en las partículas del gel. Las moléculas pequeñas que penetran efectivamente en los poros, fluirán más despacio a lo largo de la columna que las proteínas que son demasiado grandes para penetrar en los poros. Para las proteínas esféricas el volumen de tampón eluyente en que aparecen está relacionado con su peso molecular".

Con éste método, utilizando un gel con un rango adecuado de exclusión (así el Sephadex G-50 con un rango de exclusión de 1.500-30.000 es el indicado para incluir la CT con un Pm de 3.500) se puede obtener una buena separación de las tres fracciones originadas en un marcaje: hormona marcada no dañada, fracción "dañada" e isótopo libre.

Utilizando sustancias que retienen entre sus partículas a las proteínas se puede conseguir la separación del isótopo libre por simple centrifugación y decantación. Dentro de este apartado son el QUSO (sílice en polvo) y el Talco las sustancias más comúnmente empleadas.

Finalmente un método cómodo y rápido para retirar el isótopo no incorporado durante el marcaje es utilizar una RESINA DE INTERCAMBIO ANIONICO como la Amberlita o la resina AG-I.X10 de BioRad que por una acción instantánea adsorben el isótopo entre sus mallas.

I.b.2.c. ANTICUERPOS, (AB).

Si disponer de un antígeno suficientemente puro y estable es una condición básica para el montaje de un RIA no lo es menos el poseer un AB específico y en cantidad suficiente. Sin ambos elementos un RIA no puede alcanzar suficiente sensibilidad.

Las hormonas de elevado Pm con numerosos determinantes antigénicos suelen poseer elevada capacidad antigénica por lo que el animal de laboratorio produce rápidamente y a alta concentración anticuerpos frente a ella. Sin embargo la obtención de AB frente a sustancias de bajo Pm (inferior a 6000) puede ser muy difícil. Como para la inmunización del animal no es necesario que el antígeno sea puro se ha recurrido en estos casos a acoplarlo a residuos como la Hemocianina (351) o el Coadyuvante Completo de Freund (387) que incrementan el tamaño de su molécula y aumentan considerablemente su capacidad antigénica, (416).

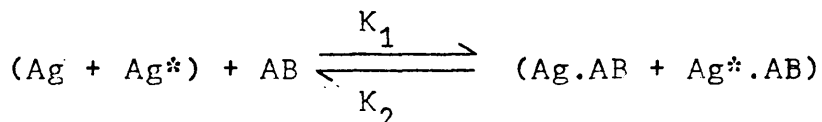
Los animales utilizados para producir AB son generalmente el conejo y el cobaya, y menos veces el cerdo, el pollo y el mono.

En la inmunización se siguen en esquema los pasos siguientes: 1) En el dorso del animal se le inyectan subcutáneamente en 20 ó más puntos distintos dosis pequeñas del antígeno solo o ligado a Hemocianina o al Coadyuvante Completo de Freund. La cantidad inyectada y el número de animales inmunizados dependen de la cantidad de antígeno disponible, recomendándose utilizar en cada inmunización no menos de 0,1 mg en un volumen de 1 a 2 ml por animal y no menos de cinco animales. 2) A los 15 y 30 días de la primera inmunización se repiten nuevas dosis de recuerdo administradas también por vía subcutánea. Algunos investigadores el mismo

día de la primera sensibilización inyectan por vía intradérmica en una zona alejada del dorso 0,5 ml de una vacuna de Bordetella Pertusis para estimular aún más su sistema inmunitario (396). 3) A partir del 45-60 día postinmunización se extraen periódicamente muestras de sangre por punción venosa o cardíaca y los sueros obtenidos se valoran en cuanto a su capacidad de reaccionar con el antígeno homólogo marcado con un isótopo. Por una reacción de inmunopurificación, es decir realizando RIAs con una cantidad constante de antígeno frío y diluciones progresivas del suero, se selecciona el suero con mayores afinidad y especificidad. La afinidad equivale a la mayor o menor capacidad de unión con el antígeno. La especificidad se determina poniendo en contacto el AB con sustancias similares a la que se utilizó para inmunizar a los animales. Ejemplos de reacción cruzada indeseable los tenemos en AB que lo son a la vez frente a Gastrina y Pancreozimina, o AB frente a Glucagon y Gastrina simultáneamente.

1.b.2.d. CONDICIONES DEL ENSAYO.

DURACION DE LA INCUBACION: La reacción que se produce en un RIA, cuyo principio teórico se recoge más adelante reproduciendo el esquema clásico de Yalow y Berson, sigue la Ley de Acción de Masas:



y aunque teóricamente K_1 es mucho mayor que K_2 y, por tanto, debería producirse en un corto espacio de tiempo, en la práctica se precisan varios días para que tal reacción alcance el equilibrio.

Los elementos de la reacción pueden introducirse todos al mismo tiempo hasta que alcanzan el equilibrio y es interrumpido el ensayo (técnica de equilibrio), o bien se puede iniciar el análisis con la hormona fría y el AB, añadiendo el trazador cuando la primera parte de la reacción ha alcanzado el equilibrio (técnica de saturación secuencial).

Con esta segunda técnica que interrumpe la reacción antes de que la segunda parte de la misma llegue al equilibrio se puede elevar la sensibilidad en algunos RIAs (430 , 431).

VOLUMEN DE INCUBACION: Aunque en la mayoría de los casos oscila entre 0,4 y 0,5 ml por tubo el volumen de incubación puede oscilar según los RIAs entre 0,15 y 1 ó 2 ml por tubo. Tal elección depende de la sustancia a medir y del método de separación utilizado, teniendo en cuenta que cuanto menor sea dicho volumen mayor trascendencia tendrán los errores cometidos en el pipeteo de los componentes, (126).

TEMPERATURA: Hay descritos RIAs en los que la elevación de la temperatura permite alcanzar antes la situación de equilibrio y por tanto acortar la duración de la incubación; en otros casos sin embargo es imprescindible realizar la incubación a bajas temperaturas.

I.b.2.e. MÉTODOS PARA SEPARAR EL COMPLEJO ANTIGENO-AB.

El fundamento del RIA es la competición entre una sustancia (AG) y la misma sustancia marcada (AG*) por los lugares de unión del anticuerpo (AB). Por tanto al finalizar la reacción se habrán originado complejos AG-AB y AG*-AB que será preciso separar de la fracción de AG y AG* que no se ligaron al AB. Seguidamente recogemos los métodos que pueden emplearse para realizar tal separación:

Métodos de Separación de las Fracciones Libre y Ligada:

(Según Yalow, Ref. 417 ,modificado).

a) ADSORCION DE LA HORMONA LIBRE:

- Cromatoelectroforesis. - Talco. - Tierra de Fuller.
- Carbón Activado.-Quso.- Resinas de Intercambio Iónico.

b) SEPARACION SELECTIVA DE LA FRACCION LIGADA:

- Dioxano. -Polietilenglicol.-Sulfato Amónico. -Etanol.
 - Precipitación Inmunológica (Doble anticuerpo).
 - Métodos de Fase Sólida: AB ligado a Sephadex.
- AB ligado a polímeros sintéticos.

c) SEPARACION POR LA DIFERENTE MOVILIDAD DE LAS HORMONAS

- LIBRE Y LIGADA: - Cromatografía en Columna.
- Cromatoelectroforesis.

De entre los métodos descritos en la página anterior para la separación de las fracciones libre y ligada en el RIA de CT se utilizan los tres siguientes:

- a) Adsorción de la CT libre por Carbón Activado: Se basa en que este producto solo o asociado al Dextrano retiene entre sus mallas los péptidos de bajo Pm (hormona libre) pero no los complejos hormona-AB,(184). Este, al igual que otros métodos que utilizan un adsorbente de la fracción libre (QUSO, TALCO...) tienen la ventaja de deparar una separación irreversible y casi instantánea, además de no tener limitación de volumen.
- b) Precipitación del Complejo AG-AB (Fracción Ligada) por Dioxano o Polietilenglicol. Cualquiera de estas dos sustancias precipitan la fracción ligada mientras que el sobrenadante que contiene la fracción libre se separa por simple decantación (112, 174).
- c) Precipitación de la Fracción Ligada con un Segundo AB, Método del Doble Anticuerpo. Este método tiene la ventaja de poder ser aplicado a cualquier ensayo independientemente de la naturaleza de la sustancia, pero tiene el inconveniente de la interferencia del 2º anticuerpo con las proteínas del suero ensayado,(417).

I.b.2.f. CRITERIOS DE VALIDACION DEL RIA.(Ref.243).

La fiabilidad de las técnicas de Desplazamiento Competitivo y entre ellas el RIA viene dada por los cuatro criterios básicos de: PRECISION, EXACTITUD, SENSIBILIDAD y ESPECIFICIDAD.

No es lo mismo precisión y exactitud. Una técnica es exacta cuando mide la cantidad REAL de una sustancia presente en una muestra. Una técnica es precisa si aún sin medir la cantidad real de una sustancia, refleja con fidelidad aumentos o disminuciones de los valores reales de la misma en una muestra determinada. La Precisión refleja la reproducibilidad de la medida y se representa generalmente por la desviación standard o por el coeficiente de variación

de los replicados o del número de medidas realizadas en una muestra determinada. Cuando tales medidas se realizan en replicados de una misma muestra en el mismo ensayo se habla de variación intra-análisis; cuando la medida se hace en una misma muestra pero en distintos ensayos se habla de variación inter-análisis.

Aunque una ESPECIFICIDAD absoluta es casi inalcanzable en la práctica, éste criterio es el más importante en la validación de una técnica. Una técnica que no sea suficientemente específica, aunque cumpla los demás criterios de validación, siempre poseerá un valor limitado. Hay que demostrar que el antígeno presente en la muestra biológica y el utilizado como standard combinan de la misma forma con el anticuerpo, y que, bajo las condiciones de análisis elegidas, otras sustancias presentes en la muestra biológica no modifican la determinación.

Una condición necesaria, pero no suficiente, que indicaría una misma reactividad entre la muestra problema y el standard es la respuesta lineal obtenida en las concentraciones de antígeno respecto a la dilución a la que se realiza la determinación. Cuando la concentración de hormona no desciende proporcionalmente con la dilución hay que considerar la falta de especificidad de la técnica, que puede deberse a dos causas fundamentales: A) Presencia de compuestos diversos que compiten con la hormona por los lugares de unión del AB, y/o B) factores diversos que de forma inespecífica afectan de algún modo a la cinética de la reacción AG-AB.

Aunque los AB suelen mostrar gran especificidad frente a determinadas zonas de la molécula del antígeno por poseer una estructura especial, hay que tener en cuenta que tales zonas pueden ser comunes a diferentes antígenos y que actividad biológica y determinantes antigénicos no están adscritos necesariamente a la misma parte de la molécula, lo que puede afectar de forma decisiva a la especificidad de una técnica. Por otra parte la presencia en la muestra biológica de fragmentos hormonales que conservan parte de su inmunorreactividad, así como de formas heterogéneas hor

monales afectan igualmente a la especificidad de un RIA.

De la misma manera hay que considerar la presencia en la muestra biológica de hormonas inmunológica y estructuralmente relacionadas que den lugar a reacciones cruzadas significativas, como en el caso de la 5-alfa-DHT y la Testosterona utilizando un AB antitestosterona en que se obtienen curvas superponibles o paralelas.

En cuanto al efecto de factores no específicos sobre la cinética de la reacción cabe señalar la posible influencia de factores tales como la fuerza iónica del buffer utilizado (si es muy elevada puede inhibir la reacción AG-AB) y la posibilidad de alteración de la hormona radiactiva durante la incubación en buffer y muestras problema que contienen plasma y, por tanto, enzimas proteolíticos. Para salvar este problema se añaden agentes que protegen a la hormona de la acción de tales enzimas proteolíticos, (EDTA, Trasylol, 6-Mercaptoetanol...).

La SENSIBILIDAD ha sido definida por Ekins como "la precisión en el punto cero", o precisión en la medida del punto cero. Sin embargo no hay un acuerdo general en este concepto y algunos consideran que es la pendiente de la curva la que define la sensibilidad del método (Berson, Yalow).

Un medio para comprobar la sensibilidad es añadir a una muestra biológica cantidades crecientes de hormona y observar la correspondencia entre lo que se añade y lo que se mide..

Este criterio de validación ha dado lugar a múltiples controversias especialmente en lo que se refiere a su explicación matemática. A continuación recogemos la deducción matemática que Yalow y Berson desarrollaban en el libro de W.D. Odell y W.H. Daughaday: "Principles of Competitive Protein-Binding Assays" (J.B. Lippincott Co. Philadelphia & Toronto, 1971).

El cálculo de la cantidad más pequeña de hormona fría detectable en un RIA puede hacerse a partir de un modelo sencillo tal como:

$Ag + AB \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} Ag \cdot AB$, en el que la constante de equilibrio

$$K = \frac{K_1}{K_2} = \frac{(Ag \cdot AB)}{(Ag)(AB)}, \text{ siendo } (Ag \cdot AB) \text{ la fracción de Ag ligada}$$

al AB (Fracción B), y (Ag) = fracción de Ag no ligada al AB (Fracción F). AB^0 = n° total de lugares de unión del AB, luego:

$$AB^0 = (Ag \cdot AB) + (AB) = B + (AB); \quad (AB) = (AB^0) - B;$$

$$K = \frac{(Ag \cdot AB)}{(Ag)(AB)} = \frac{B}{F \cdot (AB)}; \quad B/F = K \cdot (AB) = K \{ (AB^0) - B \}$$

Si $B + F = H$,

$$B/F = \frac{B}{H-B} = K \{ (AB^0) - B \}; \quad B = K \{ (AB^0) - B \} \cdot (H - B)$$

$$\text{luego: } B = K \{ AB^0 \cdot H - AB^0 \cdot B - BH + B^2 \}$$

$$B/K = AB^0 \cdot H - AB^0 \cdot B - B \cdot H + B^2; \quad B^2 + AB^0 H - B \cdot AB^0 - B \cdot H - B/K = 0$$

$$B^2 - (AB^0 + H + 1/K) \cdot B + AB^0 H = 0, \text{ y por tanto:}$$

$$B = \frac{AB^0 + H + 1/K \pm \sqrt{(AB^0 + H + 1/K)^2 - 4 \cdot AB^0 \cdot H}}{2}$$

$$B = 1/2 \left\{ AB^0 + H + 1/K \pm \left[(AB^0 + H + 1/K)^2 - 4AB^0 \cdot H \right]^{1/2} \right\}$$

$$B = 1/2 \left\{ AB^0 + H + 1/K \pm (AB^0 + H + 1/K)^2 \cdot \left(1 - \frac{4 \cdot AB^0 \cdot H}{(AB^0 + H + 1/K)^2} \right)^{1/2} \right\},$$

aplicando una serie binomial y simplificando, se tiene:

$$B = 1/2 (AB^0 + H + 1/K) \left\{ 1 \pm \left(1 - \frac{4 \cdot AB^0 \cdot H}{(AB^0 + H + 1/K)^2} \right)^{1/2} \right\}$$

$$B = 1/2 (AB^{\circ} + H + 1/K) \cdot 1/2 \cdot \frac{4 \cdot AB^{\circ} \cdot H}{(AB^{\circ} + H + 1/K)^2} = 1/4 \cdot \frac{4 \cdot AB^{\circ} \cdot H}{AB^{\circ} + H + 1/K} =$$

$$B = \frac{AB^{\circ} \cdot H}{AB^{\circ} + H + 1/K} = \frac{AB^{\circ} \cdot H \cdot K}{AB^{\circ} \cdot K + K \cdot H + 1}, \text{ y utilizando :}$$

$$B/H - B = \frac{AB^{\circ} \cdot H}{AB^{\circ} + H + 1/K} \cdot \frac{1}{H - B}; \quad B/H - B = K(AB^{\circ} - B)$$

$$H - B = \frac{B}{K(AB^{\circ} - B)}; \quad B/H - B = \frac{AB^{\circ} \cdot H \cdot K}{K \cdot AB^{\circ} + K \cdot H + 1} \cdot \frac{1}{H - B}$$

$$\begin{aligned} B/F &= \frac{K \cdot AB^{\circ} \cdot H}{K \cdot AB^{\circ} + K \cdot H + 1} \cdot \frac{K(AB^{\circ} - B)}{B} = \\ &= \frac{K^2 (AB^{\circ})^2 \cdot H}{B(K \cdot AB^{\circ} + K \cdot H + 1)} - \frac{K^2 \cdot AB^{\circ} \cdot H \cdot B}{(K \cdot AB^{\circ} + K \cdot H + 1)B} \end{aligned}$$

sustituyendo en la expresión anterior el valor de B por:

$$B = \frac{AB^{\circ} \cdot H \cdot K}{AB^{\circ} \cdot K + K \cdot H + 1} \quad \text{se tiene:}$$

$$B/F = \frac{K^2 \cdot (AB^{\circ})^2 \cdot H}{\frac{AB^{\circ} \cdot H \cdot K}{AB^{\circ} \cdot K + K \cdot H + 1} \cdot (K \cdot AB^{\circ} + K \cdot H + 1)} - \frac{K^2 \cdot (AB^{\circ}) \cdot H}{(K \cdot AB^{\circ} + K \cdot H + 1)}$$

$$B/F \approx K \cdot (AB^{\circ}) - \frac{K^2 \cdot (AB^{\circ}) \cdot (H)}{K \cdot (AB^{\circ}) + K(H) + 1}; \quad \text{como la derivada de}$$

$K(AB^{\circ})$, una constante, es igual a cero, se puede escribir:

$$\frac{d(B/F)}{d(H)} \approx - \frac{(B/F)^2}{(AB^{\circ}) \cdot [K \cdot (AB^{\circ}) + 1]} \quad \text{esta expresión nos}$$

define la sensibilidad como la derivada del cociente B/F con respecto a H, y alcanza un máximo cuando (AB°) es reducido al valor más bajo posible.

El mínimo valor que puede alcanzar AB° se deduce a partir de la expresión: $B/F = K (AB^\circ) - B$;

$$AB^\circ - B = \frac{B/F}{K} ; \quad AB^\circ = \frac{B/F}{K} + B. \quad \text{Por tanto: } AB^\circ \geq \frac{B/F}{K} ;$$

AB° será mínimo si $AB^\circ = \frac{B/F}{K}$ y la sensibilidad será máxima si AB° toma ese mínimo valor. Si se sustituye en la última expresión de la página anterior puede escribirse:

$$\begin{aligned} \frac{d(B/F)}{d(H)} &\approx - \frac{(B/F)^2}{\frac{(B/F)}{K} \cdot K \cdot \left[\frac{(B/F)}{K} + 1 \right]} \approx - \frac{(B/F)^2 \cdot K}{(B/F) \cdot \left[\frac{(B/F)}{K} + 1 \right] \cdot K} \approx \\ &\approx - \frac{(B/F)}{\frac{(B/F)}{K} + 1} \approx - \frac{(B/F)}{\frac{(B/F) + K}{K}} \approx - \frac{(B/F) \cdot K}{(B/F) + K} \end{aligned}$$

Si llamamos b a la fracción ligada en %:

$b = (B/H)$, y la fracción libre es f , se tiene que $b + f = 1$, y la sensibilidad en sentido estricto vendrá dada por la ecuación:

$$S = \frac{d(b)}{d(H)} = -K \cdot b(1-b)^2$$

como el máximo de una función se obtiene igualando la primera derivada a cero, se tiene:

$$\frac{d(S)}{d(H)} = -K \cdot [(1-b)^2 - b \cdot 2(1-b)] \cdot d(B)/d(H) = 0$$

$$1 + b^2 - 2b - 2b + 2b^2 = 0 ; \quad 3b^2 - 4b + 1 = 0$$

$$b = \frac{4 \pm \sqrt{16-12}}{6} = \frac{4 \pm 2}{6} = \frac{1}{2/6} = 0,33 \quad \text{como } b \text{ no}$$

puede ser =1, ya que ello implicaría un 100% de "binding", la máxima sensibilidad corresponde según este desarrollo a un binding del 33%, ($b/H = 33\%$). Si $b = 0,33$, como $b+f=1$, $f = 0,66$ y por tanto: $b(H) = B$; $f(H) = F$;

$$\frac{b(H)}{f(H)} = B/H = b/f = \frac{0,33}{0,66} = 1/2 = 0,5 \quad \text{lo que nos indi-}$$

ca que la máxima sensibilidad de un RIA se conseguirá cuando B/F sea = 1/2.

Los métodos prácticos se basan en el empleo de hipérbolas para deducir la cantidad de hormona fría contenida en las muestras ensayadas, en las abscisas del sistema cartesiano, a partir de la radiactividad (cpm) correspondiente representada en ordenadas. El método desarrollado por J. Tamarit (ref. 381) se basa en el empleo de una hipérbola de ecuación:

$$(y - a) \cdot (x + b) = K$$

siendo $y =$ cpm en las ordenadas, correspondientes a cada muestra.

$a =$ límite inferior asintótico para concentraciones infinitas de hormona no marcada.

$x =$ concentraciones de hormona no marcada.

$b =$ posición de la asíntota vertical en el lado de las abscisas negativas y que tiene un significado similar a la constante de afinidad K_m .

En ocasiones y especialmente para concentraciones pequeñas se obtienen mejores resultados utilizando la ecuación anterior pero sometiendo a la condición de pasar exactamente por el valor de y_0 correspondiente a $x=0$. Cuando x es $=0$,

$$y_0 = (K/B) + a$$

puediendo obtenerse a partir de ambas expresiones:

$$x = (K/B) \frac{x}{y_0 - y} - b$$

El contenido de hormona fría de una muestra puede calcularse a partir de la expresión:

$$(y - a)(x + b) = K \text{ ,, de manera que: } x = \frac{K}{(y - a)} - b.$$

El error cometido en una determinación viene dado por: $\sigma(x) = \frac{-K \cdot d(y)}{(y - a)^2}$ siendo $d(y)$ el error estándar medio entre el triplicado de las cpm correspondientes a un punto.

En este modelo matemático la sensibilidad (S) o cantidad mínima de hormona detectable en un ensayo es (381):

$$S = 0,01. b. (1 + \frac{a.b}{K})$$

I.c. SINDROMES ENDOCRINOS ASOCIADOS CON NEOPLASIAS.

En un Case Records del Massachussets General Hospital en el año 1941 ya Albright sugería que algunos cánceres podían producir una sustancia similar a la Parathormona (PTH), (5). Tal hipótesis no solamente se ha visto confirmada respecto a la PTH sino que puede aplicarse a un buen número de otras hormonas totalmente independientes entre sí. Al abigarrado conjunto de manifestaciones clínicas que se incluyen en el Síndrome Paraneoplásico descrito en todos los textos de Medicina hay que añadir la gran variedad de síndromes endocrinos que se han descrito asociados a neoplasias.

Los avances en el conocimiento de la Fisiología y Bioquímica de las hormonas, la mejora en la sensibilidad de los métodos empleados en las determinaciones bioquímicas y hormonales, la cateterización selectiva de vasos eferentes de tumores, junto con el análisis in vitro de plasma y tejidos tumorales han permitido la identificación y mejor conocimiento de algunos de estos procesos.

En el cuadro 1 se apuntan los síndromes endocrinos que hasta hoy han sido descritos asociados a neoplasias.

La etiopatogenia de estos procesos se intentado explicar mediante hipótesis basadas en puntos de vista genético, bioquímico e inmunológico. Para algunos autores al producción de una determinada hormona estaría restringida a un limitado grupo de tumores como se puede apreciar en el cuadro 1 . Esta hipótesis opone un serio reparo a la idea de la desdiferenciación como determinante de la producción hormonal por los tumores, ya que si tal desdiferenciación se produce al azar no debería haber relación entre la hormona producida y el tumor originario, (12).

Por otro lado falta un conocimiento exacto de la naturaleza química de las hormonas producidas por tumores no endocrinos. La teoría de la DES-REPRESION supone

que la célula tumoral puede volver a la capacidad multipotencial de la célula primitiva y en consecuencia recuperar la potencia de sintetizar proteínas cuyo mensaje genético de síntesis proteica se halla reprimido por las Histonas, de modo que información genética inhibida en condiciones normales pasa a ser expresada, (82). Como la malignidad es por sí misma una anomalía genética, no es extraño que las células que han adquirido la propiedad de un crecimiento autónomo pueden mostrar otra anomalía genética. Esta teoría de la des-represión necesita la demostración de que la molécula hormonal elaborada por el tumor sea idéntica a la producida por la glándula que normalmente la origina. Pero en la mayoría de los casos la cantidad de sustancia producida por el tumor es muy escasa e insuficiente para determinar su secuencia de aminoácidos. Aún en el caso de PTH, ACTH, Renina y Gastrina cuyos Pm y características inmunológicas se han demostrado diferentes a las hormonas nativas, no se puede asegurar que los tejidos hayan sintetizado una forma distinta de la hormona. Ello es así porque el tumor puede elaborar un precursor (159) que por falta del enzima convertidor no se transforma en hormona "hija", o bien por que haya diferencias en el metabolismo y degradación de la hormona. Finalmente hay que tener en cuenta que la identidad inmunológica en un RIA no implica identidad bioquímica ni de secuencia de aminoácidos.

Otro mecanismo que potencialmente puede dar lugar a la adquisición de nuevas propiedades por las células tumorales es el de la hibridación celular (402). Por este mecanismo, *in vitro* se han originado características nuevas en células que han sido hibridizadas con otro tipo celular diferente. Esta vía no ha podido ser demostrada aún en tumores humanos.

La hipótesis de Weichert (406) ya adelantada páginas atrás sostiene que la etiología de éstos tumores productores de hormonas está relacionada con un origen embrio

lógico común a partir del neuroectodermo; las células endocrinas del tracto alimentario con caracteres secretorios derivarían de células neuroectodérmicas igualmente con capacidad secretora, que emigrarían con células endodérmicas de hipófisis, tiroides, páncreas, etc. Según ésta idea tumores productores de hormonas polipeptídicas pueden originarse a partir de células APUD localizadas en tejidos endodérmicos como el pulmón. Tampoco esta hipótesis, a pesar de ser atractiva para explicar la asociación de múltiples neoplasias endocrinas en un mismo individuo, es confirmada por todos los experimentos. Así, trabajos de Le Douarin y Teillet (226) por un lado y Pictet y cols. (303) por otro, indican que las células enterocromafines no derivan necesariamente de la cresta neural, aunque no niegan la posibilidad de que células ectodérmicas emigren al endodermo en estadios iniciales del desarrollo.

Con un criterio ecléctico Levine y Metz (231) basándose en la asociación de determinados síndromes endocrinos con determinados tipos histológicos de tumores realizan una original clasificación de los tumores productores de hormonas. El grupo I comprende tumores originados de células APUD y, al menos teóricamente, derivados de la Cresta Neural producirían ACTH, Calcitonina, Insulina, MSH, ADH, Glucagon, Gastrina, Secretina, Catecolaminas, Serotonina e Histamina. Dentro de este grupo se incluirían el "oat-cell" carcinoma de bronquio, tumores pancreáticos de células insulares, Carcinoma Medular Tiroideo, Timomas, Tumores de Conductos Biliares y pancreáticos, y Carcinoides intestinales.

El grupo II incluye tumores mesodérmicos como el Hepatoma, Hipernefroma, Tumores de Corteza Suprarrenal, Tumores Gonadales, Tumores Vasculares y Carcinoma Pulmonar de células escamosas. Estos tejidos serían capaces de elaborar PTH, Eritropoyetina, Lactógeno Placentario, Prolactina, Gonadotropinas, STH, Sustancias con actividad Insulín-like, Renina, y TSH.

Dentro del grupo III entrarían los tumores de transición capaces de producir hormonas elaboradas tanto por tumores del grupo I como del grupo II. Este grupo III comprende el Feocromocitoma, Ganglioneuroma, Neuroblastoma y Paraganglioma.

Antes de detallar algunos de los cuadros endocrinos más significativos dentro de éste capítulo de elaboración hormonal por tumores de estirpe no endocrina, es conveniente, siguiendo a Sherwood (348), hacer unas consideraciones generales:

a) Estos síndromes no son curiosidades médicas ya que cada vez y a medida que se piensa más en ellos se detectan con mayor frecuencia.

b) La detección de una sustancia hormonal elaborada por una neoplasia puede servir de etiqueta tumoral e incluso ser muy útil para su diagnóstico precoz, así como para deducir la recurrencia o remisión tumoral.

c) La comprensión de los mecanismos por los que se desarrollan éstos síndromes puede permitir un conocimiento mejor del proceso de diferenciación en células normales.

d) Los efectos metabólicos y bioquímicos producidos por la sustancia hormonal ectópica pueden ser más perjudiciales para el enfermo que el mismo tumor.

e) Es posible que las hormonas originadas en un tumor den lugar a alteraciones bioquímicas exclusivamente sin acompañarse de los hallazgos clínicos que cabría esperar.

f) Las modificaciones endocrino-metabólicas secundarias a la hormona elaborada por un tumor pueden superponerse a las causadas primariamente por dicho tumor dando lugar a cuadros clínicos confusos.

g) La cateterización selectiva venosa de sangre drenada directamente de un tumor y la cuantificación por RIA de diversas hormonas puede servir para localizar el lugar exacto de producción hormonal.

Finalmente para considerar que un tumor no endocrino es el responsable de la producción de una sustancia hormonal determinada es preciso el cumplimiento de las siguientes condiciones:

- 1) La neoplasia ha de demostrarse que es capaz de elaborar sustancias humores.
- 2) Tales sustancias han de poderse demostrar en sangre periférica y ser capaces de causar un síndrome clínico atribuible a ellas.
- 3) El síndrome endocrino debe mejorar con la extirpación o tratamiento eficaz del tumor.
- 4) Debe producirse una recurrencia en las alteraciones metabólicas coincidiendo con metástasis o recurrencia del tumor, y,
- 5) debe ser posible la extracción hormonal a partir del tejido tumoral o sus metástasis y poderse medir por bioensayo o RIA.

CUADRO 1 . Modificado de Ross ,Gordan (159) y Sherwood (348).

SINDROMES ENDOCRINOS ASOCIADOS A NEOPLASIAS DESCRITOS HASTA HOY.

	<u>HORMONA o PEPTIDO ECTOPICO</u>	<u>ANOMALIA CLINICO-METABOLICA</u>	<u>TUMOR PRIMARIO</u>
1	PTH	Hipercalcemia, constipación, vómitos, psicosis...	Pulmón(C.escamosas), Riñón, Utero, Ovario, Vulva,Vejiga.
2	ACTH	S.de Cushing, alcalosis hipokalemica, facies, estrias,...	Bronquio (oat cell), Páncreas, Timo, Tiroides, Estómago, Ovario, Colon, Próstata, Feocromocitoma.
3	Alfa y Beta-MSH	Pigmentación.	Bronquio(oat cell), Timo, Páncreas.
4	ADH	Hiponatremia dilucional, sobre- hidratación, edema cerebral ...	Bronquio (oat cell, 341, 342), Cerebelo, Timo, Duodeno, Linfoma, Páncreas, Ca. de c.alveolares.

SINDROMES ENDOCRINOS ASOCIADOS A NEOPLASIAS DESCRITOS HASTA HOY.

(continuación).

	<u>HORMONA O PEPTIDO</u> <u>ECTOPICO</u>	<u>ANOMALIA</u> <u>CLINICO-METABOLICA</u>	<u>TUMOR</u> <u>PRIMARIO.</u>
5	TSH	Hipertiroidismo	Coriocarcinoma, Mola hidatiforme, Embrioma Testi- cular, Mesotelioma Ca. de Bronquio.
6	Prolactina	Galactorrea	Hipernefroma, Ca. indiferenciado de bronquio.
7	FSH y LH	Ginecomastia, Pubertad Precoz, Aumento en la Producción de Estrógenos.	Hepatocarcinoma, Ca. de Bronquio, Teratocarcinoma.
8	Gastrina	Aumento en la Acidez Gástrica. (Ulcus Péptico).	Células pancreá- ticas no beta.
9	Serotonina	Diarrea, Flush, Dolor Abdominal.	Carcinoide del Delgado, Neos de Ciego, apén- dice y Bronquio (334).
10	5-OH-Triptófano, Histamina.	Taquicardia, Flush, Hipoten- sión.	Carcinoide de Bronquio, Oat Cell de Bron- quio (161), Adenoca. de Páncreas.
11	STH	Proliferación Periostal, Osteo- artrópatía.	Adenoca. de Bron- quio (367).
12	Insulina	Hipoglucemia, (sudoración, hambre...).	Hepatoma (246 ,252) Hemangiopericito- ma, Ca. de Supra- rrenales (297).
13	Eritropoyetina	Eritrocitosis.	Hemangioblastoma de Cerebelo (308) Adenoma Suprarre- nal, Ca. Renal, Fibroma Uterino (244, 398)

SINDROMES ENDOCRINOS ASOCIADOS A NEOPLASIAS DESCRITOS HASTA HOY.

(continuación).

	<u>HORMONA O PEPTIDO ECTOPICO</u>	<u>ANOMALIA CLINICO- METABOLICA</u>	<u>TUMOR PRIMARIO.</u>
14	Gonadotropina Coriónica.	Pubertad Precoz, Ginecomastia.	Hepatoblastoma, Ca. de Corteza Suprarrenal, Ca. indiferenciado de Pulmón, Coriocar- cinoma, Pinealoma.
15	Lactógeno Placentario.	Galactorrea.	Ca. Indiferenciado de Pulmón, Hepatoma, Linfoma, Feocromo- citoma.
16	Prostaglandina E ₂		Carcinoma Renal, Ca. de Bronquio.
17	Factor Activador de los Osteoclas- tos.	Osteolisis.	Mieloma, Linfoma de Burkitt.
18	Somatomedina.		Tumores Mesodér- micos.
19	Calcitonina		Oat cell Carcino- ma de Bronquio, Mama, Páncreas...
20	Glucagon		Tumores de célu- las pancreáticas no beta, Ca. indi- ferenciado de Bron- quio.
21	Renina	Hipertensión.	Tumores del Apa- rato yuxtaglome- rular, Tumor de Wilms.

A continuación se recogen algunas de las características de estos síndromes endocrinos consecutivos a la elaboración hormonal por tumores de tejidos no endocrinos.

I.c.1. SINDROME DE CUSHING.

Es de éstos procesos el más frecuentemente hallado asociado a neoplasias llegando en algunas estadísticas a presentarse en el 8% de amplios grupos de tumores tomados al azar (234). Entre ellos es el carcinoma bronquial de células pequeñas donde con preferencia asientan, (26), yendo a continuación los timomas, tumores insulares pancreáticos, tiroides, carcinoide pulmonar, carcinoide pancreático y rara vez en carcinoma de colon (30) y feocromocitoma.

Por RIA se ha comprobado que la sustancia ACTH-like es similar al extremo no activo biológicamente (extremo C-terminal) de la ACTH, lo que es sorprendente por las manifestaciones clínicas de que se acompaña, (315). Además de los signos y síntomas más o menos característicos suele cursar con datos analíticos como alcalosis hipopotasémica, diabetes mellitus a veces difícilmente controlable (366) y 17-KS y 17-OHS elevados en orina que no suelen modificarse con la prueba de supresión con Dexametasona. Si esta prueba de supresión con 8 mg de Dexametasona reduce los niveles urinarios de 17-KS y 17-OHS hay que dudar del diagnóstico de Cushing secundario a neoplasia (245, 371).

La producción asociada de ACTH con otras hormonas también ha sido demostrada. Himsworth (193) ha descrito el caso de un hepatoma que cursaba con niveles elevados de "Big-ACTH" y Calcitonina, y Akoun y cols. (4) hallan un carcinoma anaplásico de células pequeñas de bronquio secretor simultáneamente de ACTH, ADH, MSH y Calcitonina.

Es posible además que el tejido neoplásico elabore el factor hipotalámico liberador de ACTH como ya ha sido descrito. (394).

Finalmente Gewirtz y Yalow han encontrado niveles plasmáticos de ACTH por encima de la normalidad en pacientes con broncopatía obstructiva crónica, (146).

I.c.2. HIPERTIROIDISMO.

Los pocos casos de hipertiroidismo paraneoplásico aparecidos en la literatura se han descrito asociados a coriocarcinomas, mola hidatiforme, carcinoma testicular y rara vez en carcinoma de bronquio. La serie más amplia de éste síndrome ha sido recogida por Galton detectando una sustancia TSH-like en 13 pacientes con mola hidatiforme (142). Tal sustancia posee un Pm superior al de la TSH humana (185).

I.c.3. SECRECION INADECUADA DE HORMONA ANTIDIURETICA (SIADH).

En los años 1957 y 1960 W.B.Schwartz y F.C. Bartter y cols. (341, 342) publicaban el hallazgo en un carcinoma broncogénico de un síndrome que cursaba con elevadas pérdidas urinarias de sodio e hiponatremia, atribuyendo dichas alteraciones a una secreción inadecuada de ADH. En 1967 hacían su ya clásica comunicación (33) en la que detallaban los signos de este síndrome junto con los diversos procesos patológicos en los que había sido encontrado.

Las condiciones cardinales para el diagnóstico del SIADH son: 1) Hiponatremia y consecuentemente hiposmolaridad sérica y del líquido extracelular. 2) Excreción renal continua de sodio (natriuria alta). 3) Hiperosmolaridad de la orina en relación con la hiposmolaridad plasmática. 4) Funciones renal y suprarrenal normales.

La excreción renal de sodio a pesar de la hiponatremia se intenta explicar por un incremento en la presión hidrostática en los capilares peritubulares junto con un descenso en la presión oncótica a ese nivel, (119).

Los procesos en los que se ha observado esta producción impropia de ADH son:

- a) Tumores malignos: ca. bronquial, ca. duodenal, ca. de páncreas, tumores malignos de timo.
- b) Enfermedades de Sistema Nervioso Central: meningitis, traumatismos craneales, absceso cerebral, encefalitis, tumores cerebrales, Guillain-Barré, Hemorragia subaracnoidea, Porfiria Aguda Intermitente.

- c) Neumopatías: neumonías, tuberculosis, aspergiliosis.
- d) Casos Idiopáticos.

I.C.4. HIPOGLUCEMIA Y TUMORES NO PANCREATICOS.

Los tumores extrapancreáticos en los que se ha observado hipoglucemia han sido tumores mesenquimales de gran peso, tales como Fibrosarcomas (torácicos, peritoneales, y retroperitoneales), (113), Hemangiopericitomas (237), Carcinomas de Corteza Suprarrenal (105, 297) y Hepatomas, (252).

Con respecto a la hipoglucemia observada en hepatomas (hasta un 30% de los hepatomas cursarían con hipoglucemia en algunas estadísticas como la de McFadzean y Young - 252-) Hay que señalar como dato curioso su mayor frecuencia en pacientes que tienen buen apetito y escasa pérdida de peso coincidiendo con tumores bien diferenciados y ricos en glucógeno.

Los mecanismos por los que se ha justificado tal hipoglucemia son: 1) Utilización y consumo de glucosa incrementados. 2) Alteraciones en los mecanismos fisiológicos de compensación de la hipoglucemia como la gliconeogénesis. El consumo de glucosa a su vez puede ser consecuencia de una sobreproducción de Insulina, presencia de sustancias insulín-like elaboradas por los tumores, inhibición de la insulina, secreción de metabolitos que liberan insulina del páncreas, y consumo exagerado de glucosa por la gran actividad metabólica de algunos grandes tumores mesenquimales.

Otra vía para justificar la hipoglucemia sería que algunos tumores como el leiomioma retroperitoneal pueden elaborar gran cantidad de metabolitos derivados del Triptófano que inhiben enzimas relacionados con la gluconeogénesis.

Finalmente es posible que algunos tumores elaboren un polipéptido con actividad liberadora de Insulina (Insulín-Releasing-Polipeptide -IRP-) como ha sido apuntado por Turner y Marks, (392).

I.c.5. TUMORES ELABORADORES DE GONADOTROPINAS.

Los tumores no endocrinos en los que hasta hoy se ha demostrado la producción de HCG (Human-Chorionic-Gonadotropin-like) son carcinomas bronquiales y más rara vez carcinoma de corteza suprarrenal, condrosarcoma (247), carcinoma renal y disgerminoma ovárico (76). Clínicamente los enfermos suelen mostrar ginecomastia bilateral.

Una subunidad de la HCG (fracción beta) (55) con mínima actividad biológica ha sido demostrada en algunos carcinomas de bronquio y de mama. Por otra parte la producción de sustancias LH-like (manifestadas por pubertad precoz) ha podido comprobarse en hepatoblastomas (328). Además se ha descrito un carcinoma de bronquio secretor de FSH que solo podía ser medida por RIA (328), y un hipernefroma asociado a hiperprolactinemia y galactorrea (391).

I.c.6. STH y TUMORES NO HIPOFISARIOS.

La asociación de tres casos de carcinoma bronquial con acromegalia ya fué publicada en 1962 por Williams y Celestin (⁴¹⁰), pero hasta unos años después no se pudieron determinar niveles elevados de STH en carcinomas bronquiales, niveles que regresaban a límites normales con la exéresis tumoral, (274, 163). Además se han comunicado neoplasias gástricas y pulmonares que cursaron con cifras elevadas de STH pero sin el cuadro clínico acompañante, (35).

I.c.7. SECRECIÓN INADECUADA DE ERITROPOYETINA.

Dejando a un lado la secreción excesiva de Eritropoyetina por diversas enfermedades renales, se han podido demostrar niveles elevados de la misma en tumores como hepatomas (246), fibromas uterinos (280), hemangioblastomas de cerebelo (308) y adenomas suprarrenales (244).

I.c.8. OSTEOMALACIA HIPOFOSFATEMICA PARANEOPLASICA.

Este síndrome se ha descrito en distintos hemangiopericitomas (283, 332, 365) y neurofibromas, atribuyéndose la hipofosfatemia a la acción de una sustancia aún no identificada, distinta a la PTH, con capacidad fosfatúrica.

I.c.9. PRODUCCION POR NEOPLASIAS DE LACTOGENO PLACENTARIO
(HPL) o SOMATOMAMOTROFINA CORIONICA HUMANA (HCS).

Dentro de la notoria similitud estructural existente entre algunas hormonas placentarias e hipofisarias, el HPL es idéntico a la STH hipofisaria en el 86% de su secuencia aminoácida (347). La producción de HPL ha sido demostrada en carcinoma pulmonar (167), hepatomas (329), leucosis y linfomas (329) y feocromocitomas malignos (329). La concordancia entre las concentraciones séricas de HPL, gonadotropina coriónica y fosfatasa alcalina placentaria constituyen tres marcadores tumorales de gran interés (269).

I.c.10. TUMORES ELABORADORES DE RENINA.

La primera comunicación sobre la producción por tumores no renales de Renina se debe a Hollifield y cols, al hallar hiper=reninemia en un oat cell carcinoma de bronquio. Hechos similares han sido descritos en carcinomas renales y tumores de Wilms (316).

I.c.11. PROLACTINA.

La producción de Prolactina se ha observado en carcinomas indiferenciados de pulmón y carcinomas renales (316;391).

I.c.12. SINDROME DE PRODUCCION TUMORAL NO PARATIROIDEA DE PTH.

Siguiendo a Buckle (60) puede escribirse que la causa más frecuente de hipercalcemia son las enfermedades neoplásicas. Dentro de ellas ocupa el primer lugar el cáncer de mama con metástasis óseas que cursaría con hipercalcemia en un 20-40% de los casos (206). A continuación se encontrarían el hipernefroma, carcinoma bronquial, carcinoma tiroideo, de ovario, colon, mieloma, linfoma, más rara vez próstata y en la infancia, leucosis agudas.

Estos procesos malignos depararían hipercalcemia a través de metástasis óseas por infiltración directa (81) y se acompañarían frecuentemente de normo o hiperfosfatemia y elevación en los niveles de fosfatasa alcalina.

Sin embargo, en un porcentaje considerable de casos (15% en la revisión de Lafferty - 220-) cursarían con hipercalcemia pero sin metástasis óseas demostradas, y además en algunos de ellos hay hipofosfatemia. Esta asociación de calcio elevado y fósforo bajo ya llevó en 1941 a Albright a enunciar la hipótesis de que algunos tumores podrían sintetizar parathormona (PTH) o sustancias similares a la PTH (5), y en 1956 se habían publicado dos trabajos por separado comunicando la desaparición de la hipercalcemia acompañante a dos neoplasias después de la exéresis tumoral (88, 304).

El término pseudohiperparatiroidismo fué acuñado por Lafferty para designar aquellos casos de carcinomas que sin metástasis óseas cursan con hipercalcemia e hipofosfatemia (220). como si elaboraran una sustancia con acción similar a la de la PTH. De estos tumores productores de PTH (o sustancia similar) el 60% son carcinomas pulmonares de células escamosas y tumores renales (adenocarcinoma e hipernefoma); el 40% restante se reparte entre carcinomas de hígado, páncreas, colon, esófago, ovario, útero, parótida, vías biliares, pene, tumores bronquiales de células no escamosas, linfomas, enfermedad de Hodgkin y reticulosarcomas. Son excepcionales los tumores de mama que cursan con producción de PTH (255).

El parecido entre las sustancias producidas por los tumores y la PTH se basa en su inmuno-reacción con un antisuero antiPTH (59).

Por ultracentrifugación parece ser que el extracto tumoral posee un Pm similar al de la PTH (346) pero los niveles en sangre de esta sustancia PTH-like son inferiores a los observados en los casos de hiperparatiroidismo primario.

La extirpación del tumor productor de PTH se sigue de una reducción de la calcemia, vuelta a la normalidad del manejo renal de fósforo y disminución en la concentración plasmática de la sustancia PTH (o PTH-like) (216).

Lo que falta por aclarar, (al igual que pasa con otras muchas sustancias de acción hormonal), es la naturaleza exacta de la sustancia PTH-like segregada por las neoplasias, ya que aunque probablemente tal material sea heterogéneo y se componga de varias fracciones de diferente actividad inmunológica, no se ha podido demostrar su estructura peptídica ni su secuencia de aminoácidos (43).

Hay que señalar otras dos vías por las cuales puede aparecer hipercalcemia en procesos neoplásicos sin involucrar a la PTH. Una sería la capacidad de ciertos tumores de elaborar sustancias vitamina D-like como ha podido observarse en algunos carcinomas de mama (157,158); la otra vía sería a través de la producción de Prostaglandinas (PG). Se sabe que las PG incrementan la actividad de la Adenil-Ciclasa en el hueso y ,a través de ella, el C-AMP. Tanto la PG E₁ como la E₂ han demostrado una capacidad estimuladora de la reabsorción ósea en cultivos de tejidos (219). Algunos fibrosarcomas pueden producir grandes cantidades de PG E₂ (386) y se ha observado que cuando su síntesis es inhibida con Indometacina se produce un descenso en la reabsorción ósea y en la calcemia, (230).

Puede concluirse por tanto que la hipercalcemia es un hallazgo no excepcional en neoplasias y no limitado a la presencia de metástasis óseas. Hasta hoy se han estudiado algunos agentes humorales con capacidad para deparar hipercalcemia, cuyos caracteres se describan arriba.

I.c.13. PROSTAGLANDINAS.

Además de las PG E₁ y E₂ , algunos tumores pueden elaborar PG A. Sussman y cols. hallan PG A producida por un tumor anaplásico renal que cuando fué extirpado cursó con hipertensión (373). Este hecho se atribuyó a la privación brusca de la acción vasodilatadora de la PG A que evitaba la manifestación de la hipertensión.

I.c.14. PRODUCCION TUMORAL DE PROTEINAS NO HORMONALES.

ALFA - FETOPROTEINA (AFP):

Desde hace años se utiliza en la Clínica Médica la determinación de AFP como una prueba diagnóstica del carcinoma hepático. Se trata de una glicoproteína con un Pm comprendido entre 65.000 y 70.000 Daltons, que contiene aproximadamente un 4% de glícido y dos residuos de ácido Siálico por molécula. Su Pm y su carga le confieren cierta similitud con la Albúmina pero posee diferentes estructura primaria y antigenicidad (11,278).

Fundamentalmente es sintetizada en el hígado a partir de los 29-30 días de la concepción cuando ésta víscera no es más que un divertículo de yemas y conductos (148). Su síntesis alcanza un máximo hacia la 10-15 semana de gestación para a continuación descender lentamente y hallarse a una concentración de 13-86 $\mu\text{g/ml}$ al nacimiento. Este descenso prosigue hasta los dos años de edad hasta alcanzar el nivel que conservará en el adulto de 1-2 ng/ml (148). Durante la gestación la AFP fetal pasa a la circulación materna y al líquido amniótico, lo que explica porqué en mujeres embarazadas normales se hayan encontrado niveles superiores a 500 ng/ml (344).

Sin embargo, lo que ha hecho interesante la determinación de AFP ha sido su presencia a títulos elevados en diversas neoplasias y de manera especial en las primarias del hígado (1,395).

La alta incidencia de hepatomas en Japón, 1/3 de las neoplasias vistas en autopsia - 264, justifica que las más amplias estadísticas de esta enfermedad procedan de aquel país. Un 80% de los hepatomas asientan sobre cirrosis previas, pero es sorprendente que en Japón, donde solo un 9% de las cirrosis asientan sobre una historia de etilismo, un 40% de las cirrosis desarrollan hepatoma (331). La estadística de Lehman también confirma la mayor incidencia de hepatoma sobre cirrosis posthepatítica, y añade la observación de que casi un 90% de pacientes con hepatopatía crónica muestran elevaciones transitorias de AFP sin tumor asociado (228).

Niveles significativamente elevados de AFP han sido encontrados también en neoformaciones desarrolladas en tejidos no hepáticos. Así Abelev y cols entre 32 casos de teratoblastoma testicular descubren 13 (40%) con AFP positiva (1). Teratocarcinomas de ovario, testículo, mediastino, encéfalo y región sacrocoxígea han sido publicados con AFP positiva (2,249,250), e incluso ésta determinación ha servido como un parámetro del progreso de la enfermedad o de su respuesta a la terapéutica (214).

Es preciso considerar que otras enfermedades hepáticas como cirrosis, hepatitis víricas, hepatitis crónicas persistentes y activas, hepatitis alcohólicas y hepatitis tóxicas pueden cursar con AFP positiva (10-24% de algunas estadísticas) pero a niveles comprendidos entre 20 y 200 ng/ml y con carácter transitorio (228). Igualmente, tumores originados en estómago, páncreas, vesícula, vías biliares y bronquio pueden cursar con AFP positiva, pero excepcionalmente supera los 2000 ng/ml.

Para F.G. Lehman la AFP es un marcador tumoral de hepatomas y tumores disembrionarios (teratomas, teratoblastomas-carcinomas...) ya que en ellos supera ampliamente los 2000 ng/ml y se encuentra a niveles del orden de $\mu\text{g/ml}$. Por debajo de tal cifra la interpretación clínica puede originar error y controversia, (228).

FOSFATASA ALCALINA PLACENTARIA: (FAP):

La producción de una FAP ha sido observada en una amplia diversidad de tumores como hepatomas, carcinomas bronquiales y pleuritis carcinomatosa (130, 190, 370, 272). Además se han demostrado isoenzimas de ésta FAP como el isoenzima Regan y sus variantes y el isoenzima Nagao, en otras neoplasias (272, 189).

Con el empleo de métodos ultrasensibles para su detección se han encontrado cantidades mínimas de FAP en personas sanas y en pacientes afectados de patología no neoplasia como colitis ulcerosa y cirrosis hepática (130).

GLUCOGENO FOSFORILASA; ALDOLASAS; GLUCOSAMINO-6-P-SINTETASA;
TRANSAMINASAS:

Sato y cols habían publicado en 1975 (335) el resultado de su investigación en hígado de rata de diversos enzimas como la Glucosa-6-P-fosfotransferasa, Aldolasa, Adenil-Ciclasa y Piruvato-kinasa. Describían allí como el hígado de rata adulta posee un isoenzima de G-6-P-PT de forma predominante, pero en hepatomas muy indiferenciados aparecían en tejido hepático isoenzimas que apenas eran detectables en el hígado sano. El mismo hecho pudieron observar con los isoenzimas de la glucógeno-fosforilasa (336).

En los seres superiores se conocen 3 tipos de Aldolasas: la A o muscular, la B o hepática y la C predominante en encéfalo. En el hígado fetal de rata se encuentran las tres formas pero en el hígado adulto solo la Aldolasa B. En hepatoma de rata se encuentran las aldolasas A y C indicando una vuelta a los estadios iniciales de la embriogénesis (179).

La Glucosamino-6-P-sintetasa presente en el hepatoma posee características diferentes del enzima encontrado en el hígado normal (390), y la isoenzimas de la Leucino-aminotransferasa encontrados en el hepatoma experimental de rata poseen una distribución porcentual similar a la hallada en el hígado fetal (203).

ANTIGENO CARCINOEMBRIÓNICO (ACE):

Es una glicoproteína compuesta en un 35-46% de proteína y en un 45-57% de carbohidrato, con un Pm de 175.000 y un coeficiente de sedimentación de 6,8 S descrito por primera vez por Gold y Freedman en 1965 (121, 152, 219). No se conoce sin embargo cual es la porción de su molécula responsable de su antigenicidad, factor éste que limita extraordinariamente la sensibilidad y especificidad de los métodos de detección (86). Su heterogeneidad ha sido demostrada (217) pero a pesar de ello es un buen marcador de tumores de colon.

En carcinomas inducidos de intestino en la rata se han hallado diferentes antígenos, algunos de ellos

similares al ACE de las neoplasias humanas de colon (360).

ALFA-2-H-GLOBULINA:

Se trata de una globulina que emigra con las alfa-2 y apellidada H por su origen hepático. Fué detectada hacia 1965 y se ha encontrado en escasa cantidad en el hígado normal y muy aumentada en el hígado fetal e hígado tumoral (61). Los sujetos normales muestran niveles séricos inferiores a 150 mg/ml pero en hepatomas y carcinomas de pulmón, colon, estómago, páncreas y mama tal cifra puede ser muy superior y servir como índice de la evolución de la enfermedad.

ISOFERRITINA;

Drysdale y Alpert han identificado en varias neoplasias una proteína que contiene una cantidad abundante de hierro no en forma de Hem, que emigra electroforéticamente como una beta globulina y química e inmunológicamente es similar a la Ferritina (115).

FERRITINA;

En hepatomas humanos se ha descrito la presencia de una ferritina específicamente elaborada por el tumor pero con una mayor movilidad electroforética y un punto isoeléctrico más ácido que la ferritina normal (10). No solamente ha sido hallada esta proteína en hepatomas sino que Niitsu y cols la han observado en otros tipos de neoplasias y leucosis (277).

I.d. CALCITONINA EN TUMORES NO TIROIDEOS.

En 1973 Voelkel y cols. publicaban el estudio de dos pacientes con carcinoma medular tiroideo, uno de los cuales tenía además múltiples neuromas mucosos y una ganglioneuromatosis; el otro conllevaba además del carcinoma tiroideo, un feocromocitoma bilateral. Biológica e inmunológicamente demostraban la presencia de altas concentraciones de CT en los neuromas linguales y en los feocromocitomas después de descartar posibles metástasis del carcinoma tiroideo a ese nivel. Describían también la sorprendente observación de que las catecolaminas originadas en los feocromocitomas inhibían el efecto hipocalcemiante de la CT, (400).

Silva y cols han hallado cifras elevadas de CT en un adenocarcinoma bronquial, demostrando con la cateterización venosa del tiroides que era ahí donde se producía el exceso de CT y que el drenaje venoso del tumor mostraba niveles similares a los hallados en sangre periférica, (350, 354). Sin embargo los mismos autores, en un paciente afecto de un carcinoma bronquial de células pequeñas observaron una significativa elevación de CT en sangre de la vena tímica izquierda que drenaba el tumor, mientras que en las venas tiroideas la CT era normal. En una serie de 26 carcinomas bronquiales de células pequeñas encontraron CT significativamente elevada en 16 (62%) en un rango comprendido entre 100 y 16.000 ng/ml, (354).

Coombes y cols comunicaban en 1974 la presencia de niveles altos de CT en 21 de 46 (45%) pacientes con neoplasias no tiroideas (89)), y Milhaud y cols (261) entre 35 neoplasias no tiroideas observan que 5 carcinomas bronquiales de células pequeñas cursaron con CT elevada (0,3-0,4 ng/ml), fenómeno que también encontraron en 5 de 11 carcinoides, 1 de 3 feocromocitomas y 4 de 10 melanomas.

Himsworth y cols han publicado el extraordinario caso de un tumor hepático de estirpe APUD, productor simultáneamente de "big ACTH", CT y beta-MSH (193). Histológicamente se observaban células epiteliales dispuestas en trabéculas con hialinización de su estroma y carácter argiró-fili, con gránulos citoplasmáticos de secreción visibles con el microscopio electrónico.

Otros autores han descrito la producción asociada de CT, ACTH, ADH y MSH por carcinomas bronquiales (4) y Dubrisay y cols encuentran hipercalcitoninemia en un extraño tumor pleural e intrarraquídeo que no lograron clasificar anatómopatológicamente (117).

I.e. HETEROGENEIDAD DE HORMONAS PEPTIDICAS.

Hace aproximadamente 50 años que se extrajo y purificó la primera hormona peptídica (la Insulina) y su metodología de extracción y purificación, como para otras muchas hormonas, se basó en el ensayo biológico de la sustancia hormonal. Tal método tenía el inconveniente de ignorar, al no detectarlas sustancias con muy escasa o nula actividad biológica como los precursores o prohormonas y subunidades o metabolitos derivados pero a los que no puede negarse el calificativo de hormonales. Gracias a la técnica radioinmunoanalítica (RIA) y a los conocimientos derivados de ella ha podido saberse que la mayoría de las hormonas peptídicas se hallan en plasma y/o en el tejido glandular originario en más de una forma (426).

Las causas de heterogeneidad de hormonas peptídicas ha sido muy bien sintetizada por Franchimont y Heynen de la forma que seguidamente se detalla, (136):

- 1) Precursores o prohormonas. 2) Isohormonas. 3) Polímeros.
- 4) Subunidades. 5) Metabolitos. 6) Proteínas Transportadoras.
- 7) Artefactos durante la extracción y purificación.
- 8) Análogos hormonales producidos por tumores.

La primera sugerencia sobre la posible heterogeneidad de una hormona polipeptídica se debe a Berson y Yalow que ya en 1968 habían observado como después de la administración i.v de PTH bovina a un conejo la velocidad de aclaramiento de la misma era distinta según el tipo de antisuero que utilizaran (44). Estudios posteriores con fraccionamientos en Sephadex permitieron el hallazgo, además de la PTH nativa con un Pm de 9.500 Daltons aproximadamente, de otra forma con un Pm comprendido entre 6000 y 7000, así como una Pro-PTH de Pm aprox. de 11.500 (212,356). Se admite que el paso de PTH glandular a las otras formas de menor Pm se realiza por escisión enzimática probablemente a nivel glandular.

Con respecto a la Insulina hay que señalar los trabajos de Steiner y cols demostrando que las cadenas A y B de la Insulina forman parte de una única cadena polipeptídica (Proinsulina) que da lugar a la Insulina, (368). Yalow y Berson, por otro lado, encuentran en un insulinoma una forma de Insulina que por filtración en Sephadex emigra casi coincidiendo con la gamma globulina, forma de actividad biológica similar a la de la Insulina nativa y a la que denominaron "big-big Insulin" ,(423).

Lo dicho arriba puede aplicarse a la Gastrina. Yalow y Berson por electroforesis en gel de almidón identificaron un componente de Gastrina que posee una movilidad que corresponde a un péptido de tamaño mayor al de la Gastrina humana, y denominaron a esta forma "big Gastrin"(420) Además por filtración en gel (Sephadex G-50) encuentran otra forma de mayor Pm aún (que emigra en el volumen vacío del gel junto con la albúmina-I.131) a la que llaman "big-big-Gastrin, (422,424).

Si se pasa un extracto de hipófisis anterior por una columna de Sephadex G-50 puede obtenerse no solamente la forma purificada de ACTH que eluye a mitad de camino entre el volumen vacío y el volumen de las sales, sino también otra forma que corre justo después del volumen vacío y que es la "big-ACTH", (421,427). Aunque no posee actividad biológica (340) la big-ACTH mantiene su integridad en el re-

fraccionamiento e inmunológicamente es indistinguible de la ACTH. En una serie de 59 pacientes de carcinoma bronquial, Gewirtz y Yalow encuentran 30 con niveles de ACTH superiores a 150 pg/ml, de los que la "big-ACTH" era el principal componente mientras que en personas normales solo representa entre el 5 y el 10% de la ACTH total,(145). No extraña por tanto que la "big-ACTH" haya sido considerada como un marcador tumoral útil para el diagnóstico y la evaluación de la respuesta a la terapéutica.

En cuanto a la heterogeneidad de la STH hay que destacar los trabajos de Goodman y cols (156) y Gorden y cols (160) comprobando por cromatografía en Sephadex G-75 y G-100 respectivamente, un componente de la STH que eluye entre la albúmina y la STH pura. Este componente constituye el 24-37% de la STH detectada en individuos normales y el 6-14% en acromegálicos.

La heterogeneidad de la LH y FSH circulantes también ha sido demostrada,(428).

Lo escrito arriba recoge una lista incompleta de hormonas cuya heterogeneidad ha sido suficientemente demostrada. Posiblemente, como R.S. Yalow, a quien seguimos en este apartado, indica en las conclusiones de su comunicación el Recent Progress in Hormone Research de 1974 (426); la mayoría de las hormonas peptídicas se sintetizan en un precursor de mayor Pm, a partir del cual alcanzan la circulación periférica. Fragmentos de la hormona nativa pueden también ser detectados por un antisuero y tanto los precursores como los fragmentos y demás factores que determinan la heterogeneidad de las hormonas peptídicas complican la interpretación de los valores hormonales obtenidos por RIA.

R.S. Yalow finalizaba aquella comunicación con cinco preguntas hoy aún no respondidas: ¿La síntesis de la hormona peptídica se realiza en una forma ligada a un péptido esencial solo para su almacenamiento y liberación, o hay otro mecanismo involucrado?, ¿cuales son los enzimas responsables del proceso de conversión?, ¿los enzimas convertidores son específicos de cada hormona?, ¿el fenómeno de paso de

prohormona a hormona se realiza solo en la glándula productora, o es a nivel periférico donde se produce el paso de forma inactiva a forma activa?, ¿cuál es el papel del fragmento de la molécula de precursor que se libera después de la biosíntesis de la hormona?. La respuesta a estas preguntas facilitará sin duda no solo un mejor conocimiento del metabolismo hormonal sino también una más correcta valoración de la cuantificación hormonal realizada por RIA y su inmediata aplicación a la Clínica.

I.f. HETEROGENEIDAD DE CALCITONINA.

También en la Calcitonina (CT) hay suficientes evidencias de que tanto a nivel glandular como en sangre periférica hay más de una forma hormonal.

Roos y cols, trabajando con suspensiones de células productoras de CT obtenidas de glándulas ultimobranquiales de trucha, encuentran mediante métodos inmunológicos un precursor de CT con un Pm aproximado de 7.000, (326).

Estudios realizados en extractos tisulares de carcinomas medulares tiroideos demuestran la formación in situ de agregados y polímeros junto con el monómero de CT, (209).

Sizemore y cols, utilizando dos tipos distintos de antisuero con diferente afinidad por los extremos terminales $-NH_2$ y $-COOH$ del monómero de CT, encuentran en plasmas de 18 pacientes con carcinoma medular tiroideo varias formas de CT; con uno de los antisueros reconocen cinco formas que en Bio-Gel P-150 eluyen antes o con el monómero de CT; el antisuero con afinidad por el extremo $-COOH$ detectaba solo dos formas, uno que eluía en la zona del monómero de CT y otra en la del dímero, y en ningún caso encontraban especies con Pm inferior al del monómero de CT, (359).

Deftos y cols detectan en plasmas de 13 pacientes con carcinoma medular tiroideo y en un tumor insular pancreático productor de CT filtrados por columnas de

Bio-Gel P-30, utilizando dos antisueros distintos, varias formas inmunorreactivas de CT. Según el antisuero los resultados eran diferentes, ya que mientras uno de ellos daba estimaciones más elevadas de CT en los plasmas de los pacientes con carcinoma tiroideo, el otro detectaba niveles más altos de CT en el caso del carcinoma pancreático,(108).

Silva y cols con filtración en Sephadex G-75 encuentran cinco formas inmunorreactivas de CT en pacientes con carcinoma medular tiroideo, con una distribución muy similar a la descrita por Snider y cols; los Pm aproximados de tales especies son: 14.000 (fracción II), 5.200 (fracción III), 3.400 (fracción IV), 2.400 (fracción V) y una fracción (fracción I) que eluye con el volumen vacío ,(352,361). En trabajos posteriores han demostrado que la infusión de calcio en individuos normales produce un aumento de la CT que eluye en el pico IV, mientras que en un paciente con un carcinoma medular tiroideo tal elevación fué en la fracción V,(355).

Sin embargo, y quizá por utilizar un antisuero diferente, Singer y Habener detectan con filtración en Bio-Gel P-10 de plasmas de pacientes con carcinoma medular tiroideo solo cuatro picos o fracciones de CT, tres con Pm superior al del monómero de CT,(357).

Finalmente es preciso señalar los trabajos de Goltzman efectuados en carcinomas medulares tiroideos mantenidos en cultivo. La CT liberada por el tejido tumoral comparada con los perfiles de elución en Bio-Gel P-10 de plasmas efectuadas antes de la extripación, mostró idéntica heterogeneidad; toda la CT eluía con o antes del monómero de CT y solo el pico que coeluí con el monómero de HCT demostró poseer capacidad estimuladora de la Adenil-Ciclasa en membrana renal de conejo. Sugería, en consecuencia, que la heterogeneidad de la HCT no debe ser consecuencia de su metabolismo periférico y que probablemente solo el monómero debe tener actividad biológica,(153).

II. PROPOSITOS.

II. PROPOSITOS.

- 1º.- Estudiar los niveles de CT sérica en los diversos tipos de neoformaciones tiroideas.
- 2º.- Estudiar los niveles séricos de CT en neoformaciones no tiroideas buscando una posible relación entre determinadas estirpes tumorales con hipercalcitoninemia. ¿Podría ser la Calcitonina un marcador de otros tumores además del Carcinoma Medular Tiroideo?.
- 3º.- Investigar la heterogeneidad de la Calcitonina circulante en sangre periférica. Esto se realizará en aquellos casos en los que la Calcitonina basal, o tras pruebas de estimulación, sea suficientemente elevada como para que su fraccionamiento en gel permita la detección de aquellos componentes incluidos en la sensibilidad de nuestro radioinmunoensayo.

III. PACIENTES, MATERIAL Y METODOS.

III.a. MATERIAL.

COMPUESTOS ESPECIALES.

En el RIA de Calcitonina Humana (HCT) y en el estudio de su heterogeneidad se han empleado los siguientes compuestos especiales:

- Calcitonina Humana (HCT) sintética, amablemente donada en forma liofilizada por Ciba-Geigy S.A.
- Iodo-125 (I-125) para marcaje de proteínas del Radiochemical Centre Amersham (Referencia IMS-30).
- Anticuerpos anti-HCT obtenidos en conejo, comercializados por Calbiochem A.G (Referencia:869.046).
- Anticuerpos anti-HCT obtenidos en cabra, del EPSG (European PTH Study Group), Lote 08-V-75, gentilmente cedidos por el Dr. Pedro Esbrit (Clínica de la Concepción, Madrid).
- Resina intercambiadora de aniones AGI-x10 (100-200 mesh) de Bio Rad labs.
- QUSO-G32 (sílice finamente pulverizada) de la Philadelphia Quartz.
- Carbón Activado, de Sigma Chem. Co.
- Dextrano T-70, de Pharmacia Fine Chemicals.
- 2-Mercaptoetanol, de Merck.
- Sephadex G-50, G-75 y G-100 de Pharmacia Fine Chemicals.
- Albúmina Bovina, de Behringwerke A.G.
- Suero Bovino ultrafiltrado, de Flow Labs.
- Urea purísima, Probus.

MATERIAL DE LABORATORIO.

- Centrífuga Refrigerada Sorvall RC2-B.
- Centrífuga Analmatic-100, Searle.
- Contador Gamma Nuclear Chicago, Mod.8742.
- Contador de Radiaciones Packard, Mod.A-5105-01.
- Colector de Fracciones LKB Bromma 7000,Ultrorac.
- Juego de micropipetas Eppendorf.
- Juego de micropipetas Biopette, Schwartz/Man.
- Mezcladores rotativos Analmatic,mod.10.
- Balanza Sartorius, mod.2492.
- Balanza Oertling, mod.R-20.
- Espectrofotómetro Perkin Elmer, mod.124.
- Calculadora programable Canon-Canola 167-P.

III.b. METODOS.

III.b.1. Radioinmunoanálisis (RIA) de Calcitonina humana, (HCT).

- Iodación de la HCT.
- Cálculo de la incorporación isotópica con Talco, ácido Tricloroacético y Electroforesis en Gel.
- Purificación de la Hormona Marcada.
- Cromatoelectroforesis.
- Cromatografía en Capa Fina.
- Comprobación de la Especificidad y Titulación de los Anticuerpos utilizados.
- Incubación del Ensayo.
- Separación de las fracciones libre y ligada al anticuerpo.
- Métodos matemáticos de representación y de cálculo de resultados.

III.b.2. Fraccionamientos en Sephadex.

III.b.3. Tratamiento con Urea.

III.b.4. Tratamiento con 2-Mercaptoetanol.

III.b.4. Parámetros Complementarios.

III.b.5. HCT basal en controles.

III.b.6. Criterios de Clasificación de Pacientes.

III.b.7. Pruebas de Estimulación de la Secreción de HCT.

III.b.1. RADIOINMUNOANALISIS DE CALCITONINA HUMANA (HCT).

--- IODACION DE LA HCT.

Se sigue el método de Hunter y Greenwood al emplear Cloramina T como oxidante del isótopo y Metabisulfito Sódico como finalizador de la reacción, (200).

El protocolo de marcaje seguido es:

- a) Con una microjeringa Hamilton de 0,1 ml conectada a un catéter de nylon Portex nº1, se aspiran de manera sucesiva y dejando entre ellos un pequeño espacio vacío para que no contacten antes de lo debido, los elementos: -Buffer Fosfato 0,2 M, pH 7,5:25 microlitros, - Cloramina T (1mg/ml): 30 microlitros, - I-125 (1-1,5 mCi): 10-15 microlitros.
- b) Bruscamente se deposita el contenido del catéter sobre el tubo de plástico que contiene los 2 microgramos de HCT en un volumen de 20 microlitros (en el mismo buffer de marcaje).
- c) Agitación continua durante 30 segundos.
- d) Adición brusca sobre la mezcla anterior de 50 microlitros de una disolución de Metabisulfito Sódico en el buffer de marcaje (2,4mg/ml) equivalentes a 0,12 mg de Metabisulfito sódico.
- e) Agitación intermitente durante 10-20".
- f) Aporte al volumen anterior de 0,1 ml de una disolución de Ioduro Potásico (10mg/ml) en el buffer de marcaje.
- g) Adición de 0,1 ml de una disolución de Albúmina Bovina al 0,2% en el buffer de marcaje para que no haya adherencia de la CT a las paredes del vial.

— CALCULO DE LA INCORPORACION ISOTOPICA CON TALCO; ACIDO TRICLOROACETICO (TCA) y CROMATOGRAFIA EN GEL.

TALCO:

Este producto restiene las proteínas pero no los péptidos pequeños ni el isótopo utilizado para marcar la proteína. El método es el siguiente: una alícuota del vial de marcaje se diluye con buffer hasta que 0,1 ml den entre 40 y 50.000 cpm. Se hace por quintuplicado y a cada una de las fracciones se les pone un comprimido de 50 mg de Talco purísimo. Después de dejarlo reposar durante 5 minutos se le añade 1 ml de buffer del ensayo con un 0,2% de albúmina bovina. Tras agitar y centrifugar 10' a 3.000 rpm el sobrenadante es despreciado y contada la radiactividad del precipitado. El cociente entre las cpm del precipitado y las cpm introducidas indica, al multiplicar por 100, el % de incorporación isotópica en el marcaje.

TCA:

Aplicando la propiedad del TCA de precipitar las proteínas se puede calcular con bastante buena aproximación el % de incorporación isotópica en el marcaje. Técnica: una alícuota de 0,005 ml del vial del marcaje se diluye hasta que 0,1 ml dan 40.000-50.000 cpm. Se hace también por quintuplicado y a cada fracción se le ponen 0,8 ml del buffer de marcaje y 0,1 ml de albúmina bovina al 10% para que haya una coprecipitación. Se agita la mezcla y se le añaden 2 ml de TCA al 20% en agua destilada. Nuevamente es agitada y se deja reposar 15 minutos a 4°C. Al centrifugar durante 5 minutos a 3.000 rpm el sobrenadante es retirado por aspiración con bomba de vacío. El precipitado contendrá las proteínas tanto marcadas como no marcadas y si se compara su radiactividad frente a la introducida inicialmente se puede calcular el % de isótopo incorporado.

CROMATOGRAFIA EN GEL:

Una alícuota del vial de marcaje es pasada por una columna (0,9 x 60 cm) de Sephadex G-50 o G-75 previamente equilibrada con buffer fosfato 0,0 M, pH 7,5, y "lavada" con 0,5 ml de albúmina bovina al diez por ciento. El rango del Sephadex G-50 (1.500-30.000) permite separar tres fracciones o picos de radiactividad: el primero eluye en el volumen vacío de la columna y contiene la fracción dañada durante el marcaje; el segundo corresponde al pico hormonal (HCT) y sustancias que eluyan en el volumen incluido de la columna; finalmente el tercer pico contiene el isótopo libre y los fragmentos de hormona con un peso molecular inferior al rango del Sephadex utilizado.

Si se divide la radiactividad de las fracciones I y II entre la suma de I + II + III se deduce con cierta aproximación el porcentaje de I-125 incorporado a la proteína en el marcaje.

PURIFICACION DE LA HORMONA MARCADA.

La HCT* o "trazador" que resulta del marcaje realizado en las condiciones señaladas no puede emplearse en el RIA directamente ya que está acompañada por fragmentos y agregados e isótopo no incorporado durante la iodación. Para purificarla de esos elementos que inespecíficamente pueden alterar los resultados del RIA se recurre a distintos métodos de purificación. Uno de los más utilizados sigue los siguientes pasos: a) sobre el vial de iodación se ponen 5 mg de QUSO G-32, una sílice que adsorbe entre sus mallas las moléculas de un cierto tamaño pero no las partículas pequeñas como el I-125. Tras agitar durante 2-3 minutos se centrifuga a 3.500 rpm durante 4 minutos. Retirado el sobrenadante por aspiración en bomba de vacío, sobre el precipitado se deposita una punta de espátula de una resina cambiadora de aniones como la AG.1-X.10 (100-200 mallas), agitándose durante 2' y centrifugando a continuación durante 5' a 3.500 rpm. Retirado el sobrenadante al precipitado se le pone un ml de una disolución de ácido

acético-acetona (1%-20% en agua destilada) para redisolverlo. Tras una nueva centrifugación el sobrenadante, que contiene la hormona marcada, es retirado y conservado.

La resina cambiadora de aniones es añadida para retirar el I-125 no incorporado en el marcaje ya que queda retenido entre las mallas de la resina, (172).

El trazador obtenido de esta forma se diluye en buffer fosfato 0,05M , pH 7,5 y se divide en alícuotas de 1 ml , conservándose a -20°C hasta su introducción en un análisis.

Si la hormona marcada es utilizada antes de transcurridos 10 días del marcaje puede ser utilizada sin necesidad de purificarla; a partir de los 7-10 días es purificada bien tratándola con una resina cambiadora de aniones para liberarla del isótopo libre, o bien pasándolas por una columna de Sephadex G-50 ó G-75 como se hacía con una alícuota del vial de marcaje.

CROMATOELECTROFORESIS, (CEF).

Se realiza sobre tiras de papel Wathman 3MM colocadas sobre un bastidor de madera en una cubeta de 40 x 70 cm. Como buffer se utiliza un b. Veronal 0,05M, pH 8,6. Las tiras de papel se mantienen en b. Veronal durante 60' antes de ser montadas en la cubeta. Las muestras a cromatografiar (hormona marcada no purificada, hormona marcada purificada y un control de I-125) son diluidas hasta que 0,1 ml den 15.000-25.000 cpm. Cada muestra es ensayada por duplicado y los controles de I-125 se colocan en los extremos. Como colorante empleamos el Azul de Bromofenol (50 mg diluidos en 10ml de b.fosfato 0,05M, pH 8,6, con albúmina humana al 0,5%).

Las muestras, coloreadas con el Azul de Bromofenol, se ponen sobre las tiras de papel en un espacio de 1 cm de ancho delimitado por dos líneas trazadas con lápiz a una distancia de 3cm de la base del bastidor. Después de "sembrar" las muestras la cubeta es cerrada herméticamente y se deja pasar la corriente (720 V) durante 45". A continuación se secan las tiras (sin retirarlas del bastidor) en una estu-

fa a 60°C durante una hora, para cortarlas seguidamente en fracciones de 2cm de ancho que una vez numeradas se cuentan en un contador gamma.

En una gráfica se representan las cpm de cada fracción frente a su número, calculándose el % correspondiente a hormona pura (que debe permanecer en el origen ya que el pH de 8,6 está muy próximo a su punto isoeléctrico), hormona dañada y I-125 libre.

--- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Sobre una lámina de Aluminio-Celulosa (DC-Alufolien Cellulose, Merck) se colocan en paralelo, y separadas entre sí 5 cm, fracciones de HCT no marcada (50 µg), HCT* purificada (15.000 cpm) y de I-125 (15.000 cpm). La lámina se pone vertical en el interior de una cubeta de vidrio que se cierra herméticamente y cuyas paredes interiores están recubiertas con papel empapado en el buffer eluyente (Butanol Piridina-Acético-Agua, 30-20-6-4) para saturar su atmósfera con el vapor de dicho buffer.

A las 8 horas se extrae la lámina, se seca y se corta en fracciones de 1 cm de ancho, que tras ser numeradas se cuenta su radiactividad en un contador gamma. La HCT no marcada se detecta con Ninhidrina al 0,2% en Butanol Acético (95%-5%).

--- COMPROBACION DE LA ESPECIFICIDAD Y TITULACION DE LOS ANTICUERPOS.

La especificidad de los anticuerpos (AB) anti-HCT se comprueba ensayándolos frente a HCT* y diluciones conocidas de Gastrina, Pentagastrina, Insulina y Glucagon; se ratifica ensayándolos con diluciones de HCT fría a las que se añaden alícuotas de las hormonas señaladas.

Los AB son titulados diluyéndolos en el mismo buffer en que se conserva el trazador, y utilizando una dilución tal que 0,1 ml de la misma liguén entre un 35 y un 50% del trazador introducido (10.000 cpm) en ausencia de hormona fría.

--- INCUBACION DEL ENSAYO.

El análisis se realiza siguiendo un método de Saturación Secuencial después de comprobar que la técnica de Equilibrio, la incubación es iniciada ya desde el principio con todos los elementos, ofrece curvas de menor sensibilidad. En la Saturación Secuencial la hormona marcada o trazador es añadida al análisis una vez que el primer tiempo de la incubación (reacción entre hormona fría y AB) ha alcanzado el equilibrio.

Para determinar cual ha de ser la duración óptima que permita la consecución de curvas standard con la mayor sensibilidad, se realizan incubaciones variando la duración de las dos partes del análisis. De esa manera se han probado duraciones (en días) de 1+1, 2+1, 2+2, 3+2, 3+3, 2+3, 4+2, 4+3 y 4+4, resultando que la mayor sensibilidad se conseguía cuando la incubación duraba 4+2 días.

Algo similar puede decirse del volumen de incubación, ya que tras probar volúmenes de incubación comprendidos entre 0,175 y 0,8 ml, observamos que el óptimo era el de 0,5 ml y es el que lógicamente hemos empleado de forma rutinaria.

Los elementos del ensayo se distribuyen cualitativamente como sigue:

- a) Buffer fosfato 0,05M, pH 7,5, con EDTA Sódico 0,005%, Merthiolato (como preservativo) 0,01%, y Albúmina bovina 0,5%.
- b) Alícuotas de HCT fría a concentraciones conocidas.
- c) Anticuerpo anti-HCT a una dilución tal que ligue un 35-50% del trazador en ausencia de hormona fría.
- d) Hormona Marcada o Trazador, en cantidad suficiente para dar entre 5000 y 10.000 cpm.

A continuación se indica la distribución cuantitativa de esos elementos en cada uno de los puntos que permiten el trazado de la curva standard; todo punto se ensaya por triplicado.

VOLUMEN DE LOS ELEMENTOS DEL ENSAYO EN UNA CURVA ESTANDARD.

Punto:	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<u>Buffer</u> (ml)	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4
<u>AB</u> (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0
<u>HCT_fria</u> (0,1 ml) (ng/ml)	0	5	2,5	1,0	0,75	0,5	0,25	0,1	0,05	0
<u>HCT*</u> (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

El punto cero (0) es el que ofrece un mayor "binding" ya que el AB reacciona con el trazador sin ninguna sustancia que compita con él. Contrariamente el punto 9 será el de menor "binding", o "binding" inespecífico, ya que representa las cpm ligadas en ausencia de AB.

En cada ensayo se pone un control de radiactividad total (HCT* = 0,1 ml equivalentes a 5.000-10.000 cpm) por decuplicado.

Cuando se ensayan sueros sustituyen a la HCT fria, manteniéndose el volumen de 0,5 ml para cada tubo y haciendo un triplicado de los controles sin AB. El conocimiento de "binding" inespecífico es un dato de gran importancia ya que varía mucho de unos sueros a otros al ligarse aleatoriamente el trazador a las proteínas séricas.

Para conseguir una mayor fiabilidad en los resultados de un análisis, un suero es analizado como control entero y a diluciones de 1/2, 1/5 y 1/10.

--- SEPARACION DE LAS FRACCIONES LIBRE Y LIGADA AL ANTICUERPO.

Durante el tiempo de incubación la hormona marcada (HC*) y la fria (HCT) compiten por los puntos de unión del AB. Como resultado de esa reacción antígeno-AB se forman complejos HCT-AB y HCT*-AB y quedan fracciones no ligadas de AB, HCT y HCT*. Para separar las fracciones de HCT

y HCT* de los complejos HCT-AB y HCT*-AB empleamos sistemáticamente una disolución de Carbón Activado al 5% con un 0,5% de Dextrano T-70, que causa la precipitación de la fracción libre o no ligada.

Técnica: se prepara una disolución de Carbón Activado (Sigma) y Dextrano T-70 (Pharmacia Fine Chemicals) al 5% y 0,5% respectivamente, en el buffer del ensayo. La mezcla es agitada ininterrumpidamente durante 45 minutos a 4°C y seguidamente se ponen 0,5 ml de la misma a cada tubo del ensayo. Tras dejar reposar durante 5' se centrifuga a temperatura ambiente durante 20'. El sobrenadante, con la fracción ligada, es separado por aspiración con bomba de vacío.

Para igualar el contenido proteico de los tubos de la curva standard con los que contienen los sueros ensayados, inmediatamente antes de añadir el Carbón Activado sobre aquellos se ponen 0,1 ml de suero equino o bovino.

--- METODOS MATEMATICOS DE REPRESENTACION Y DE CALCULO DE RESULTADOS.

Las curvas standard relacionan cantidades de hormona fria con las cpm ligadas en cada punto. Hay varios tipos de representación y así en unos se representa hormona fria frente al cociente B/T o cpm ligadas/cpm totales; otros relacionan hormona fria con el cociente B/F (bound/free), o B/B₀ (cpm ligadas en un punto entre las cpm del punto de máximo binding). La ecuación de Scatchard $B/F = K(AB_0 - B)$, permite calcular la concentración en peso de la hormona combinada (B) a partir del cociente B/F, la constante de equilibrio (K) y la concentración de anticuerpo empleada en el ensayo (AB₀), (381), pero tiene el inconveniente de que las variables no son datos calculados directamente en el experimento. Sin embargo, la curva standard puede adaptarse a una hipérbola de

ecuación: $(y-n)(x+b)=K$ en las que todos los elementos pueden determinarse directamente en el experimento; n es el n° de cpm combinadas inespecíficamente (en ausencia de AB); b representa la posición de la asíntota vertical en el lado de las abscisas negativas, y K es una constante, (381). Los valores de K y b se calculan transformando la ecuación hipérbólica de la curva estándar en una recta al llevar a las abscisas la concentración de hormona fría y en ordenadas el inverso de las cpm combinadas correspondientes. La recta deducida tiene como ecuación: $x = Ky + b$, en la que K viene dada por la expresión:

$$K = \frac{N \sum xy - (\sum y)(\sum x)}{N(\sum y^2) - (\sum y)^2}, \quad y, b = \frac{(\sum x)(\sum y^2) - (\sum y)(\sum xy)}{N(\sum y^2) - (\sum y)^2}$$

Tales valores son empleados en la ecuación de la hipérbola de modo que la concentración de hormona fría en un punto determinado se deduce de :

$$x = \left(\frac{K}{(y - n)} \right) - b$$

La sensibilidad en el origen o mínima cantidad de hormona detectable se obtiene de la expresión:

$$S = 0,01b \cdot \left(1 + \frac{nb}{K} \right)$$

III.b.2. FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX.

El fraccionamiento en Sephadex es una aplicación del método o técnica conocida por Filtración en Gel. La primera observación del efecto tamizador de un gel fué hecha por Synge y Tiselius en 1950 al fraccionar en un gel de agar-agar los productos de la hidrólisis de la Amilosa,(375). Lathe y Ruthven utilizaron granos de almidón y comprobaron que las proteínas no penetraban en gránulos hidratados de almidón pero podían conseguir buenas resoluciones de sustancias de Pm comprendidos entre 100 y 1000, (222). En 1959 Porath y Flodin describen el empleo de geles de Dextrano para desalar proteínas, y como resultado de la colaboración entre la escuela de Uppsala y la firma sueca AB Pharmacia surgió una amplia gama de geles de Dextrano disponibles bajo el nombre comercial de Sephadex,(305).

El Sephadex es un gel de Dextrano en forma de partículas esféricas. El Dextrano a su vez es un polímero de Glucosa anhidra producido en soluciones de Sacarosa por diferentes cepas de Leuconostoc Mesenteroides. Por su alto contenido en grupos OH en las cadenas de polisacáridos, el Sephadex es muy hidrofílico embebiéndose en agua y soluciones de electrolitos. De esa forma el Sephadex es un material cromatográficamente capaz de separar sustancias en función del tamaño de su molécula, procedimiento éste al que se denomina Filtración en Gel o Cromatografía en Gel. En el cuadro 2 , facilitado por Pharmacia Fine Chemicals se recogen las principales características de algunos tipos de Sephadex.

La ecuación básica que recoge los parámetros operacionales de ésta técnica fué enunciada por Gellotte en 1960 y es: $V_e = V_o + K_d.V_i$, siendo V_e el volumen de elución de una sustancia, V_o el volumen vacío de la columna; V_i , el volumen de agua retenido por el gel; y K_d , el coeficiente de distribución. Este coeficiente K_d posee un significado

*

CUADRO 2. PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE ALGUNOS TIPOS DE SEPHADEX.

TIPO DE SEPHADEX	RANGO PARA PROTEINAS GLOBULARES	TIEMPO MINIMO DE EMBEBIMIENTO		FLUJO OPTIMO
		Temperatura Ambiente	Agua Hirviendo	
G-25 Fino	1.000 - 5.000	3 horas	1 hora	16,5 cm/h con P de 40 cm H ₂ O
G-50 Fino	1.500 - 30.000	3 "	1 "	24 cm/hora " " " "
G-50 Superfino	1.500 - 30.000	3 "	1 "	9 cm/hora " " " "
G-75	3.000 - 70.000	24 "	3 "	0,74 ml/min en columna de 1,5 cm de diám y P-H ₂ O 50=200
G-75 Superfino	3.000 - 70.000	24 "	3 "	0,18 ml/min " " " "
G-100	4.000 - 150.000	3 dias	5 "	0,47 ml/min " " " "
G-200	5.000 - 800.000	3 "	5 "	0,12 " " " " " "
G-200 Superfino	5.000 - 800.000	3 "	5 "	0,03 " " " " " "

* Datos facilitados por Pharmacia Fine Chemicals (Sephadex.Gel Filtration in Theory and Practice.1975).

similar al de la expresión empleada en Cromatografía para referirse a la relación entre la concentración de un soluto en la fase móvil y la fase estacionaria. En la Filtración en Gel la fase estacionaria sería el agua contenida en las esferas del gel y K_d la fracción de éste agua disponible para la distribución del solvente. Conociendo el peso del gel seco (a) y el agua retenida en el gel (W_r), K_d puede obtenerse de la expresión:




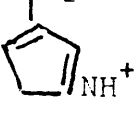


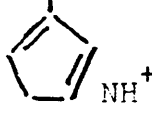
$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_s - V_o} = \frac{V_e - V^o}{V_i} = \frac{V_e - V^c}{a \cdot W_r}$$

(V_s = volumen de elución de las sales). Por tanto y a partir del K_d y W_r podría calcularse el P_m aproximado de una sustancia que eluye en un volumen V_e en una columna de Sephadex. (144)

Investigando la correlación entre volúmenes de elución y pesos moleculares, Andrews encontró que la relación entre V_e y el log. de P_m era lineal en Sephadex G-75 para sustancias de pesos moleculares comprendidos entre 5000 y 60.000, (14).

Este método de Filtración en Gel ha sido aplicado por numerosos investigadores para estudiar la heterogeneidad de las hormonas peptídicas; pero es preciso considerar que la Cromatografía en Sephadex es una técnica de Cromatografía de reparto en la que al ser eluida una sustancia a lo largo de una columna durante un periodo de tiempo más o menos largo pueden producirse agregados por interacciones moleculares. Así, intervendrían interacciones covalentes (con formación de puentes S-S), iónicas, y formación de puentes de Hidrógeno entre sus moléculas, factores todos ellos que pueden conducir a la formación de agregados.

A continuación se muestra en que puntos de la estructura primaria de la Calcitonina pueden establecerse aquellas interacciones, observándose como predomina la tendencia a la formación de puentes de Hidrógeno (señalados con el asterisco).

AA:	1	2	3*	4	5*	6*	7	8
	<u>H-Cis</u> CH ₂ SH	<u>Gli</u> H	<u>Asn</u> CH ₂ C=O NH ₂	<u>Leu</u> (CH) ₂ CH (CH ₃) ₂	<u>Ser</u> CH ₂ OH	<u>Thr</u> CH-OH CH ₃	<u>Cis</u> CH ₂ SH	<u>Met</u> (CH ₂) ₂ S CH ₃
	9	10	11*	12*	13*	14	15	16
	<u>Leu</u> (CH) ₂ CH (CH ₃) ₂	<u>Gli</u> H	<u>Thr</u> CH-OH CH ₃	<u>Tir</u> CH ₂  OH	<u>Thr</u> CH-OH CH ₃	<u>Gln</u> (CH ₂) ₂ C=O NH ₂	<u>Asp</u> CH ₂ COO ⁻	<u>Fen</u> CH ₂ 
	17*	18	19	20	21*	22	23	24*
	<u>Asn</u> (CH) ₂ C=O NH ₂	<u>Lis</u> (CH ₂) ₄ NH ₃ ⁺	<u>Fen</u> CH ₂ 	<u>His</u> CH ₂ 	<u>Thr</u> CH-OH CH ₃	<u>Fen</u> CH ₂ 	<u>Pro</u> 	<u>Gln</u> (CH ₂) ₂ C=O NH ₂
	25*	26	27	28	29	30	31	32
	<u>Thr</u> CH-OH CH ₃	<u>Ala</u> CH ₃	<u>Ile</u> CH-CH ₃ CH ₂ CH ₃	<u>Gli</u> H	<u>Val</u> CH CH ₃ CH ₃	<u>Gli</u> H	<u>Ala</u> CH ₃	<u>Pro-NH₂</u> CH ₂ 

Los aminoácidos señalados con el asterisco (*) son los puntos por donde pueden establecerse puentes hidrógeno.

Para cada uno de los factores de agregación se dispone de técnicas de neutralización. Así la formación de puentes disulfuro puede evitarse tratando la muestra con 2-Mercaptoetanol 3M (29-1) o con ácido Perfórmico (29-2); las fuerzas iónicas pueden neutralizarse con Cloruro Sódico 3M, y

las fuerzas hidrófobas con agentes detergentes como el Dodecil-Sulfato Sódico (SDS), (229).

En el caso particular de la HCT, como se deduce del esquema de la página anterior, prácticamente solo dos tipos de interacciones darán lugar a la formación de agregados, por un lado la formación de puentes disulfuro, y por otro el establecimiento de puentes de hidrógeno. Por la estructura primaria de la HCT éste último debe considerarse a priori como el factor más importante. Para evitarlo se recurre al tratamiento con Urea 8M. Otro método para la ruptura de puentes hidrógeno es el del Cloruro de Guanidinio, que no utilizamos por no aportar ventajas sobre la Urea y su precio prohibitivo.

III.b.3. TRATAMIENTO CON UREA 8M.

La preparación de la solución de Urea 8M se realiza diluyendo 480 g de Urea (Pm:60) en 1000 ml de agua destilada, (la disolución se hace sobre un plato magnético durante 6-12 h y por ser una reacción muy endergónica el recipiente se enfría). A continuación la disolución de Urea se pasa por una columna (2 x 60 cm) llena con una resina cambiadora de aniones y cationes, con lo que se eliminan iones tiocianato. Esta disolución de Urea es empleada para la preparación del buffer fosfato 0,02M, pH 7,5, con el que se empapará el gel y se eluirá la columna. Ha de tenerse en cuenta que una vez pasada por la columna de la resina (Amberlita MB-1), (29-3) la solución de Urea no puede conservarse durante más de dos semanas, y siempre a 4°C.

III.b.4. TRATAMIENTO CON 2-MERCAPTOETANOL.

Para evitar la formación de agregados secundaria al establecimiento de puentes disulfuro se recurre a tratar las muestras en las que se investiga la heterogeneidad de HCT con 2-Mercaptoetanol 3M (2-ME, 3M).

Técnica: Cada problema se estudia pasando 4 ml de suero por una columna (1,5 x 60 cm) de Sephadex G-100. Como el 2-ME tiene un Pm de 78,13 y una densidad de 1,12, el volumen de un mol será: $78,13/1,12 = 69,75$ ml. Una preparación tres molar significa que en un litro debe haber 3 moles, o, lo que es igual, en 1 ml habrá 3 milimoles, y en 4 ml 12 milimoles. El volumen de estos 12 milimoles será: $69,75 \times 12 \times 10^{-3}$ ml = 0,837 ml. Ello significa que los 4 ml de muestra a eluir se distribuyen en: 0,837 ml de 2-ME + 3,163 ml, (4-0,837), de suero, con la consiguiente dilución de la proteína en la muestra.

El suero es tratado con 2-ME dejándolos en contacto durante una hora a 25°C.

La formación de nuevos agregados por puentes disulfuro a lo largo de la elución de la muestra por la columna es obviada si se emplea un buffer eluyente con 2-ME 1M (69,75 ml de 2-ME + 930,25 ml de buffer fo fato 0,02M, pH 7,5).

III.b.5. CALIBRADO DE LA COLUMNA DE CROMATOGRAFIA.

El Pm de las diferentes formas circulantes de HCT se deduce de su volumen de elución. Para poder realizar tal extrapolación es preciso calibrar previamente la columna con sustancias de pesos moleculares conocidos. Ello se realiza pasando por la columna los siguientes controles:

- a) Azul Dextrano (Pm:2.000.000 aprox.)
- b) Albúmina Humana marcada con I-125.
- c) STH marcada con I-125.
- d) PTH marcada con I-125.
- e) Insulina marcada con I-125.

f) HCT (monómero) marcada con I-125.

g) I-125.

Si se representa gráficamente el perfil de elución de estos parámetros, basta comparar la inmunorreactividad de las fracciones obtenidas al cromatografiar una muestra de suero para deducir con cierta aproximación su P_m ; éste se calculará con mayor precisión utilizando un gráfico que relacione volúmenes de elución (V_e) de los controles con el logaritmo decimal de sus P_m respectivos, (14, 15).

III.b.6. PARAMETROS COMPLEMENTARIOS.

Los parámetros analíticos complementarios se determinaron mediante los siguientes procedimientos: Calcio, Magnesio, Sodio y Potasio por Espectrofotometría de Absorción Atómica; Fósforo en sangre y orina por el método de Fiske y Subbarow; Fosfatasa Alcalina por el método de la General Diagnostics (emplea un sustrato de Difosfato Sódico con Fenolftaleína, que reacciona con el suero, y un colorante con NaOH 0,05N).

III.b.7. HCT BASAL EN CONTROLES.

Se considera basal la HCT determinada después del tiempo transcurrido entre la cena del día anterior y el sueño nocturno de 7-9 horas con el individuo en ayunas.

La sangre se extrae en jeringa de polipropileno, por punción venosa en la flexura del codo, entre las 8 y media y nueve y media de la mañana; se deja coagular a temperatura ambiente durante un tiempo siempre inferior a 45', centrifugándose a continuación a 2500 rpm (10-15'). El suero obtenido se divide en alícuotas para determinar los parámetros analíticos complementarios y HCT. La fracción destinada a la determinación de HCT se conserva a -20°C y es ensayada antes de transcurridos 90 días desde la extracción. Esta metodología se utiliza tanto en individuos considerados normales como en los diferen-

tes pacientes.

Dentro del control de normales hemos de considerar dos subgrupos; uno lo constituyen 25 personas completamente sanas de edades comprendidas entre 20 y 38 años (estudiantes voluntarios), y el otro comprende 75 individuos afectados de distintas patologías no endocrinas, óseas, neoplásicas ni renales, es decir, procesos en los que ni directa ni indirectamente pudiera a priori haber alteraciones en la producción o eliminación de HCT.

III.b.8. CRITERIOS DE CLASIFICACION DE PACIENTES.

Se determinan niveles basales de HCT en 187 pacientes de ambos sexos y edades diversas afectados de una amplia variedad de neoplasias. Inclúyense solo aquellos procesos en los que se realizó diagnóstico anatomopatológico en vida o en la mesa de autopsias, y se excluyen los que, a pesar de poseer datos clínicos y analíticos suficientes para realizar un diagnóstico de presunción, éste no pudo confirmarse histológicamente. Tampoco se recogen las enfermedades linfoproliferativas tipo Hodgkin y linfomas no Hodgkinianos, ni las leucosis. Recogemos, no obstante, una serie de gammopatías monoclonales por la frecuente hipercalcemia acompañante secundaria a osteólisis.

Es preciso señalar que en la obtención de ésta casuística ha intervenido el azar, ya que no se compone solamente de pacientes ingresados en un Departamento Hospitalario de Medicina Interna, sino que, aunque un número considerable tiene esa procedencia, una cantidad importante fué obtenida de visitas ocasionales a Departamentos de Cirugía, Ginecología, O.R.L., etc, o facilitada por compañeros de otros Hospitales. Por ese motivo, y a pesar de que 187 constituye un número no pequeño de neoplasias, su distribución porcentual probablemente no corresponda a la que realmente se da en la práctica médica global.

También hay que tener en cuenta que los pacientes afectados de una neoplasia, y, sobre todo, cuando

son vistos en un hospital suelen hallarse severamente enfermos, por lo que se limita a lo imprescindible el número de extracciones hemáticas, y no se realizan pruebas de estimulación de la secreción de HCT de forma rutinaria. Solo en los casos de sospecha de carcinoma tiroideo con cifras de HCT dentro de o próximas a la normalidad se efectúa una estimulación con Pentagastrina o con Calcio para diagnosticar o descartar un Carcinoma Medular.

Al diagnóstico de las metástasis de un tumor primario se llega mediante exploraciones complementarias como: estudios radiológico-tomográficos, gammagrafías hepática y cerebral, electroencefalograma, ecoencefalograma, estudio isotópico óseo con pirofosfatos, y exploraciones arteriográficas como la celiacografía y arteriografía carotídea; en algunos casos, la exéresis quirúrgica de una adenopatía o la biopsia hepática permitió el diagnóstico histopatológico de las metástasis.

En la tabla de la página siguiente se recoge la distribución numérica y porcentual de los casos estudiados, y en páginas sucesivas las características histológicas y extensión de los diferentes grupos de tumores agrupados según su procedencia orgánica.(Tabla 1).

III.b.9. PRUEBAS DE ESTIMULACION DE LA SECRECION DE HCT.

Las pruebas para estimular la secreción de HCT en los casos en que estaba indicado fueron:

- a) Infusión prolongada de Calcio: 15 mg de Calcio elemento por kg de peso diluidos en 500 c.c de suero fisiológico son infundidos en 4 horas. El preparado comercial utilizado fué Calcium-Sandoz (una ampolla de 5 ml de Galacto-gluconato de Calcio contiene 45 mg de Calcio elemento).
- b) Inyección de Pentagastrina: 0,5 µg de Pentagastrina (Pentagastrina ICI) por kg de peso diluidos en 4 ml de s.fisiológico son inyectados por vía i.v en 30".

TABLA 1.

DISTRIBUCION DE LAS NEOPLASIAS EN LAS QUE SE DETERMINO HCT.

<u>ORIGEN DE LA NEOFORMACION</u>	<u>Nº DE CASOS</u>	<u>%</u>
ESTOMAGO	38	20,32
PULMON	35	18,71
TIROIDES	14	7,49
CELULAS PLASMATICAS	10	6,28
HIGADO	10	6,28
PROSTATA	6	3,21
RIÑON	6	3,21
MAMA	6	3,21
COLON	6	3,21
PANCREAS	6	3,21
UTERO	6	3,21
LARINGE	6	3,21
FARINGE	6	3,21
OVARIO	5	2,67
ESOFAGO	5	2,67
SUPRARRENALES	5	2,67
CEREBRO	5	2,67
HUESO	5	2,67
ADENOHIPOFISIS	4	2,14
PLEURA	2	1,07
GRASA RETROPERITONEAL	1	0,53
Número Total: 187		99,99 %

CUADRO 3 . NEOPLASIAS GASTRICAS.

N=38. \bar{X} Edad=69,1 años (47-84 años).

	<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS.</u>
1	H	72	Adenocarc.	—	—
2	H	72	Carcinoma	—	—
3	H	50	Adenocarc.	—	—
4	H	63	"	—	Cerebro, Hígado.
5	H	58	"	—	—
6	H	75	Carcinoma	—	—
7	H	67	"	—	—
8	H	60	Adenocarc.	—	—
9	H	69	Carcinoma	—	Cerebro.
10	H	68	Adenocarc.	—	Hígado.
11	H	68	Carcinoma	—	—
12	H	78	Adenocarc.	—	—
13	H	61	Carcinoma	—	Cerebro.
14	H	63	"	—	Cerebro.
15	H	60	"	—	—
16	H	67	"	+	Hígado.
17	H	59	Adenocarc.	—	Hígado.
18	H	69	"	Dudosa.	Hígado.
19	H	77	Carcinoma	—	—
20	H	74	"	—	—
21	H	70	"	—	—
22	H	72	"	—	—
23	H	55	Adenocarc.	—	—
24	H	67	"	—	—
25	M	80	Carcinoma	—	—
26	M	47	Ca (Linitis P.)	—	—
27	M	74	Carcinoma	—	—
28	M	80	Adenocarc.	—	—
29	M	84	Carcinoma	—	—
30	M	75	"	—	Hígado.
31	M	79	Adenocarc.	—	—
32	M	82	"	—	—
33	M	68	"	—	Hígado.
34	M	69	Carcinoma.	—	Hígado.
35	M	76	"	—	—
36	M	78	Adenocarc.	—	—
37	M	56	Carcinoma	—	—
38	M	70	"	—	—

Hombres (H)= 24 casos. \bar{X} Edad=66,8 años, (50-78).

Mujeres (M)= 14 " . \bar{X} Edad=73,0 años, (47-84). H/M=1,7 .

CUADRO 4 . NEOPLASIAS DE BRONQUIO.

N=35. \bar{X} Edad= 65,0 años (55-79).

	<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS.</u>
1	H	55	Oat Cell.	Artic.Sacro-ilíaca Derecha.	No demostradas.
2	H	61	Ca.Epidermoide.	—	" "
3	H	60	Ca.Epidermoide.	Fémur Izquierdo.	" "
4	H	57	Adenocarcinoma.	—	" "
5	H	55	Ca.Epidermoide.	—	" "
6	H	65	Ca.Epidermoide.	—	" "
7	H	60	Ca.Epidermoide.	—	" "
8	H	57	Ca.Epidermoide.	—	" "
9	H	64	Ca.Epidermoide.	—	" "
10	H	79	Oat Cell.	Fémur Izquierdo.	" "
11	H	62	Oat Cell.	—	" "
12	H	69	C.Indif. de células grandes.	—	" "
13	H	73	Ca.Epidermoide.	—	Adenopatía Supraclavic.
14	H	65	Oat Cell.	—	Hígado+Pleura +Adenopatías.
15	H	60	Ca.Indif.de células grandes.	—	Pulmón.
16	H	77	Ca.Epidermoide.	—	No demostradas.
17	H	61	Ca.Epidermoide.	—	Hígado.
18	H	69	Adenocarcinoma.	—	No demostradas.
19	H	56	Ca.Epidermoide.	Costillas + Vértebras.	Adenopatía Supraclavic.
20	H	74	Oat Cell.	—	No demostradas.
21	H	59	Oat Cell.	—	" "
22	H	68	Ca.Epidermoide.	—	" "
23	H	63	Oat Cell.	—	Hígado.
24	H	64	Adenocarcinoma.	—	No demostradas.
25	M	61	Oat Cell.	—	" "
26	M	58	Ca.Epidermoide.	Cúbito+Radio derechos+Pubis.	" "
27	M	62	Ca.C.Alveolares.	—	" "
28	M	73	Ca.Epidermoide.	—	" "
29	M	66	Ca.Indif. de células grandes.	Costillas.	Pleura.
30	M	71	Ca.Epidermoide.	—	No demostradas.
31	M	69	Ca.Epidermoide.	—	" "
32	M	74	Ca.Indif.de células grandes.	—	Pulmón.
33	M	66	Ca.Epidermoide.	—	No demostradas.
34	M	69	Oat Cell	Vértebra Lumbar.	Hígado.
35	M	73	Ca.Epidermoide.	—	No demostradas.

Hombres (H)=24 casos. \bar{X} Edad= 63,9 años (55-79).

Mujeres (M)=11 " . \bar{X} Edad= 67,5 " (58-74).

H/M= 2,18.

CUADRO 5 . NEOPLASIAS TIROIDEAS.

N=14. \bar{X} Edad=53,3 años (16-70).

N=14. X Edad=55,5 años (16-75).					OTRAS
<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS OSEAS</u>	<u>METASTASIS.</u>	
1	M	68	Ca.Indiferenc.	Clavícula izq.+ Vértebra Lumbar.	Pulmón+Adeno- patías Cervic.
2	M	70	Adenoca. Folicular.	—	Adenopatías Cervicales.
3	M	65	Ca.Anaplásico de c.grandes.	Vértebra Cervial + Ilíaco derecho.	Pulmón+Adenop.
4	M	64	Adenoca.Pa- pilar(Folicular).	—	Adenopatías Cervicales.
5	M	57	Adenoca.Papilar (Folicular).	Clavícula Derecha.	Pulmón + Adenopatías Cervicales.
6	M	59	Carcinoma Anaplásico.	Fémur izq°+ Vértebra Lumbar, + Ilíaco izq°	Adenopatías Cervicales+ Pulmón.
7	M	63	Adenoca.Papilar (Folicular).	—	Adenopatías Cervicales.
8	M	48	Ca.Medular.	Clavícula Derecha+ Vértebra Cervical.	Pulmón+Adeno- patías Cervic.
9	M	61	Ca.Medular.	—	Pulmón +Adeno- patías Cervic.
10	H	45	Ca.Medular.	—	Adenopatías Cervicales.
11	H	16	Ca.Medular.	—	Adenopatías Cervicales + Pulmón.
12	M	24	Ca.Medular.	—	—
13	H	44	Ca.Medular.	—	Adenopatías Cervicales.
14	M	63	Ca.Medular.	—	Pulmón + Adeno- patías cervic.

Mujeres (M)= 11 casos. \bar{X} Edad=58,4 años (24-70).

Hombres (H)= 3 casos. \bar{X} Edad=35,0 " (16-44). M/H=3,66.

CUADRO 6 . NEOPLASIAS DE CELULAS PLASMATICAS
(MIELOMAS)

N=10. \bar{X} Edad=70,7 años (60-82).

<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>PROTEINA AUMENTADA</u>	<u>LESION ESQUELETICA</u>	<u>AFECTACION VISCERAL</u>	
1	M	69	IgG	Columna Dorsal + Fémur derecho.	No demostrada.
2	M	71	IgG	No demostrada.	" "
3	M	74	IgG+ Bence- Jones.	Cráneo+Iliíaco+ Columna Dorsal.	Hígado.
4	H	68	IgG	Clavículas+ Húmero derecho+ Columna Dorsal.	Hígado.
5	M	60	IgA	No demostrada.	No demostrada.
6	H	82	IgG+ Bence- Jones.	Cráneo+ Fémur Izquierdo.	" "
7	H	65	IgG	No demostrada.	" "
8	M	75	IgG	Cráneo.	Hígado.
9	M	70	IgG+ Bence- Jones.	No demostrada.	No demostrada.
10	H	73	IgG + Bence- Jones.	No demostrada.	No demostrada.

Mujeres (M)= 6 casos. \bar{X} Edad= 69,8 años (60-75).

Hombres (H)= 4 casos. \bar{X} Edad= 72,0 " (65-82). M/H=1,5.

CUADRO 7 . NEOPLASIAS PRIMITIVAS DE HIGADO.

N=10. \bar{X} Edad= 64 años (54-71).

	<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
1	H	56	Hepatocarcinoma.	No demostradas.	Adenopatías regionales.
2	H	68	Hepatocarcinoma.	" "	No demostradas.
3	M	65	Hepatocarcinoma.	" "	Pulmón, Linfáticos region.
4	M	71	Colangiocarcinoma.	" "	No demostradas.
5	H	70	Hepatocarcinoma	Columna Lumbar.	Pulmón + Supra- renales.
6	H	61	Hepatocarcinoma.	No demostradas.	No demostradas.
7	M	68	Hepatocarcinoma.	Columna Dorsal.	Pulmón+Linfáticos region.
8	H	69	Hepatocarcinoma.	No demostradas.	Linfáticos regionales + Pleura.
9	H	54	Hepatocarcinoma.	Fémur derecho+ Columna Lumbar.	Pulmón+Linfáticos regionales
10	M	58	Hepatocarcinoma.	No demostradas.	Linfáticos regionales.

Hombres (H)= 6 casos. \bar{X} Edad= 63 años (54-70).

Mujeres (M)= 4 casos. \bar{X} Edad= 65,5 años (58-71). H/M=1,5.

CUADRO 8 . NEOPLASIAS DE PROSTATA.

N=6. \bar{X} Edad= 72,7 años (63-81).

	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS_OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
1	63	Adenocarcinoma.	No demostradas.	No demostradas.
2	81	Adenocarcinoma.	Columna Lumbar. (osteoblásticas).	Linfáticos regionales.
3	73	Adenocarcinoma.	No demostradas.	No demostradas.
4	70	Adenocarcinoma.	Columna Lumbar y Dorsal, e Ilíaco (blásticas y líticas.)	Linfáticos regionales.**
5	69	Adenocarcinoma.	No demostradas.	No demostradas.
6	80	Adenocarcinoma.	Columna Lumbar, Ilíaco y Fémur izquierdo.	Linfáticos regionales.

** Aunque el paciente mostró sintomatología neurológica focal congruente con alteraciones halladas en el EEG y ECO-EG, no se consiguió la confirmación necróptica.

CUADRO 9 . CARCINOMAS RENALES.

N=6. \bar{X} Edad= 58 años (33-74).

	<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
1	H	33	Hipernefroma	No demostradas.	Linfáticos regionales.
2	H	48	Hipernefroma bilateral	Fémur + Columna Lumbar.	Pulmón.
3	M	74	Hipernefroma	No demostradas.	No demostradas.
4	H	56	Carcinoma de Pelvis Renal.	No demostradas.	Infiltración de grandes vasos adyacentes y linfáticos regionales.
5	M	65	Hipernefroma.	No demostradas.	No demostradas.
6	H	72	Hipernefroma.	No demostradas.	Pulmón + Hígado.

Hombres (H)= 4 casos. \bar{X} Edad= 52,25 años (33-72). H/M= 2.
 Mujeres (M)= 2 casos. \bar{X} Edad= 69,50 años (65-74).

CUADRO 10 . NEOPLASIAS DE MAMA.

N=6. \bar{X} Edad= 63,5 años (33-75).

	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
1	33	Carcinoma Intracanalicular no infiltrante.	No demostradas.	Gánglio Axilar.
2	58	Ca.Escirroso (Intracanalicular infiltrante).	Osteolisis de Fémur derecho.	Gánglios Supraclaviculares +Pulmón.
3	74	Carcinoma Escirroso.	Osteolisis en Columna Dorsal, Parrilla Costal.	Pulmón+Pleura+ Adenopatías.
4	75	Carcinoma Escirroso.	No demostradas.	No demostradas.
5	66	Ca.Intracanalicular No Infiltrante.	No demostradas.	No demostradas.
6	69	Carcinoma Escirroso.	Costillas.	Pleura+Pulmón+ Gánglios Axilares.

CUADRO 11. NEOPLASIAS DE COLON

N=6. \bar{X} Edad= 70,5 años (62-77).

<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
1 H	62	Adenocarcinoma. (Sigma).	No demostradas.	Linfáticos regionales.
2 M	74	Adenocarcinoma. (Recto)	No demostradas.	Hígado + Encéfalo.
3 M	77	Adenocarcinoma. (Recto)	Columna Lumbar (osteolisis).	Hígado.
4 H	68	Adenocarcinoma. (Sigma)	No demostradas.	Linfáticos regionales.
5 M	70	Adenocarcinoma. (Sigma)	No demostradas.	Linfáticos regionales.
6 H	72	Adenocarcinoma. (Ciego)	Fémur izquierdo + Ilíaco.	Hígado + Pulmón+Pleura.

Hombres (H)= 3 casos. \bar{X} Edad= 67,33 años (62-72).

Mujeres (M)= 3 casos. \bar{X} Edad= 73,66 años (70-77). H/M= 1.

CUADRO 12 . NEOPLASIAS DE PANCREAS.

N=6. \bar{X} Edad= 64,33 años (48-77).

<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
1 H	48	Carcinoma.	No demostradas.	Linfáticos regionales.
2 H	56	Adenocarcinoma.	No demostradas.	Linfáticos regionales + Hígado + Peritoneo.
3 H	72	Carcinoma.	No demostradas.	Linfáticos regionales.
4 M	77	Adenocarcinoma.	No demostradas.	Linfáticos regionales.
5 M	65	Carcinoma.	No demostradas.	Linfáticos regionales + Peritoneo.
6 H	68	Carcinoma.	No demostradas.	Linfáticos regionales + Peritoneo.

Hombres (H)= 4 casos. \bar{X} Edad= 61 años (48-72).

H/M= 2.

Mujeres (M)= 2 casos. \bar{X} Edad= 71 años (65-77).

CUADRO 13 . NEOPLASIAS DE UTERO.

N=6. \bar{X} Edad= 60,66 años (49-70).

<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
1	56	Carcinoma Epidermoide de Cervix.	No demostradas. Pelvis Congelada + Hígado.
2	67	Adenocarcinoma de Endometrio.	No demostradas. Linfáticos regionales.
3	49	Carcinoma Epidermoide de Cervix.	No demostradas. Linfáticos regionales y para aórticos.
4	60	Carcinoma Epidermoide de Cervix.	No demostradas. Linfáticos regionales + Hígado.
5	62	Adenocarcinoma de Endometrio.	No demostradas. No demostradas.
6	70	Adenocarcinoma de Endometrio.	No demostradas. Linfáticos regionales.

CUADRO 14 . NEOPLASIAS DE LARINGE.

N= 6. \bar{X} Edad= 53,83 años (54-76).

	<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
1	H	58	Carcinoma Espinocelular Indiferenciado.	No demostradas.	Adenopatías regionales.
2	H	54	Carcinoma Espinocelular Indiferenciado.	No demostradas.	Adenopatías regionales + Hígado.
3	H	72	Epitelioma Espinocelular bastante dife- renciado.	No demostradas.	Adenopatías regionales.
4	H	69	Epitelioma Es- pinocelular bastante dife- renciado.	No demostradas.	No demostradas.
5	H	76	Epitelioma Espinocelular Indiferenciado.	No demostradas.	Adenopatías regionales.
6	H	63	Epitelioma Espinocelular Indiferenciado.	No demostradas.	Adenopatías regionales.

Hombres (H)= 6 casos.

CUADRO 15 . NEOPLASIAS DE FARINGE.

N=6. \bar{X} Edad= 68,5 años (60-78).

<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS_OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
1 H	62	Epitelioma Espinocelular de Seno Piri- forme.	No demostradas.	Linfáticos regionales.
2 H	74	Epit.Espino- celular de S.Piriforme.	No demostradas.	Linfáticos regionales+ plastrón cer- vical e inva- sión laríngea.
3 H	68	Epit.Espino- celular de Cavum.	No demostradas.	Linfáticos regionales.
4 M	60	Epit.Espino- celular de Cavum.	No demostradas.	Linfáticos regionales+ Supraclavicu- lares + Axi- lares.
5 M	69	Epit.Espino- celular de S.Piriforme.	No demostradas.	Linfáticos regionales.
6 H	78	Epit.Fspino- celular de Senos Piriforme.	No demostradas.	Linfáticos regionales.

Hombres (H)= 4 casos. \bar{X} Edad= 70,50 años (62-78). H/M= 2.
Mujeres (M)= 2 casos. \bar{X} Edad= 64,50 años (60-69).

CUADRO 16 .NEOPLASIAS DE OVARIO.

N=5. \bar{X} Edad= 39,4 años (26-47).

<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
1	36	Cistoadenocar- cinoma Seroso.	No demostradas. Peritoneo.
2	43	Cistoadenocar- cinoma Seroso.	No demostradas. Peritoneo.
3	26	Teratoma Quístico.	No demostradas. No demostradas.
4	45	Cistoadeno- carcinoma Seroso.	No demostradas. Peritoneo + Pleura.
5	47	Carcinoma Endometrioides.	No demostradas. Peritoneo + otro Ovario.

CUADRO 17 . NEOPLASIAS DE ESOFAGO.

N= 5. \bar{X} Edad=58 años (34-73).

<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS_OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS.</u>
1	H	68 Carcinoma Epidermoide (Cardias + 1/3 inferior)	No demostradas.	No demostradas.
2	H	54 Carcinoma Epidermoide (1/3 inferior)	No demostradas.	Hígado.
3	H	34 Ca.Epidermoide. (1/3 medio)	No demostradas.	No demostradas.
4	H	61 Ca.Epidermoide. (1/3 medio)	No demostradas.	Hígado + gánglio de Troissier.
5	H	73 Ca.Epidermoide. (1/3 medio)	No demostradas.	No demostradas.

Hombres (H)= 5 casos.

CUADRO 18. NEOPLASIAS DE LAS GLANDULAS
SUPRARRENALES

N=5. \bar{X} Edad= 36,8 años (29-49)

<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS_OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
1	M	34	Hiperplasia Bilateral, (Cushing)	No
2	H	40	Adenoma único de células claras pareci- das a las de la zona fasci- culada, (Conn)	No
3	M	32	Feocromocitoma Unilateral.	No
4	M	49	Adenoma Supra- rrenal Unilate- ral, (Cushing).	No
5	H	29	Feocromocitoma Unilateral.	No

Mujeres (M)= 3 casos. \bar{X} Edad= 38,3 años (32-49). M/H=1,5.
Hombres (H)= 2 casos. \bar{X} Edad= 34,5 " (29-40).

CUADRO 19 . NEOPLASIAS CEREBRALES.

N= 5. \bar{X} Edad= 44,2 años (34-58).

	<u>EDAD</u>	<u>SEXO</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
1	58	M	Glioblastoma Multiforme.	No	Infiltración peritumoral.
2	42	H	Glioblastoma Multiforme.	Nô	No
3	38	M	Astrocitoma de Cerebelo.	No	No
4	49	M	Tumor de Cuerpo Calloso.	No	No
5	34	H	Glioblastoma Multiforme.	No	Infiltración peritumoral.

Mujeres (M)= 3 casos. \bar{X} Edad= 48,3 años (42-58).

Hombres (H)= 2 casos. \bar{X} Edad= 38,0 años (34-42). M/H= 1,5.

CUADRO 20. NEOPLASIAS OSEAS.

N= 5. \bar{X} Edad= 28,4 años (9-50).

	<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
1	H	16	Sarcoma Osteogénico (tipo Esclerosante) de Tibia.	No demostradas.	No demostradas.
2	H	9	Fibrosarcoma de Fémur.	Iliaco.	No demostradas.
3	H	47	Sarcoma Osteogénico Esclerosante, de Húmero.	No demostradas.	Pulmón+Hígado.
4	H	20	Sarcoma Osteolítico de Fémur.	Iliaco+Columna Lumbar.	Pulmón.
5	M	50	Sarcoma Osteogénico Esclerosante de Tibia.	No demostradas.	Hígado.

Hombres (H)= 4 casos. \bar{X} Edad= 23 años (9-47)

H/M=4.

Mujeres (M)= 1 caso. Edad= 50 años.

CUADRO 21 . TUMORES DEL LOBULO ANTERIOR
DE LA HIPOFISIS.

N=4. \bar{X} Edad= 33,5 años (22-41).

<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS.</u>
1 M	22	Adenoma Eosinófilo.	No	No
2 M	34	Adenoma Eosinófilo.	No	No
3 H	37	Adenoma Eosinófilo.	No	No
4 M	41	Adenoma Eosinófilo.	No	No

Mujeres (M)= 3 casos. \bar{X} Edad= 32,3 años (22-41).

HOMBRES (H)= 1 caso. Edad=37 años.

M/H=3.

CUADRO 22 . TUMORES PRIMARIOS DE PLEURA.

N=2. \bar{X} Edad= 49 años.

	<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS_OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
1	H	43	Mesotelioma	No demostradas.	No demostradas.
2	H	55	Mesotelioma	No demostradas.	No demostradas.

CUADRO 23 . TUMORES DERIVADOS DE LA GRASA

RETROPERITONEAL.

N=1. Edad= 58 años.

	<u>SEXO</u>	<u>EDAD</u>	<u>HISTOPATOLOGIA</u>	<u>METASTASIS_OSEAS</u>	<u>OTRAS METASTASIS</u>
	M	58	Liposarcoma Retroperitoneal.	No demostradas.	Peritoneo + Pleura.

IV . RESULTADOS.

IV.1. RADIOINMUNOANALISIS DE HCT.

IV.1.a. MARCAJE DE HCT CON I^{125} .

Tras ensayar distintas condiciones de marcaje variando la concentración del oxidante Cloramina T y el tiempo de agitación de los elementos del marcaje antes de la adición del Metabisulfito Sódico, resultados recogidos en la página siguiente, se optó por el siguiente protocolo de iodación 2 microgramos de HCT en un volumen de 20 μ l se marcan con 1,5 mCi de I^{125} con 30 μ l de Cloramina T (1 mg/ml). La incorporación isotópica obtenida en los 26 marcajes realizados fué: 36,44,30,59,46,55,57,72,45,33,62,49,56,50,52,36,39,42,59,56, 34,60,51,44,38 y 39%. (\bar{X} = 47,85%).

La Actividad Específica calculada por precipitación con TCA al 20% fué: \bar{X} = 371 mCi/mg (232-480 mCi/mg).

La pureza o estabilidad del trazador obtenido en las circunstancias señaladas se comprueba en los días siguientes al marcaje mediante precipitación con TCA al 20% y cromatografía en Sephadex G-50 ó G-75. Los resultados de una media de de diez marcajes se recogen seguidamente.

DIAS DESPUES DEL MARCAJE	PUREZA CALCULADA CON TCA	PUREZA EN SEPHADEX G-50 Ó G-75	ACTIVIDAD RELATIVA**
1	93%	97%	100%
7	92%	94%	92,2%
16	85%	90%	83,1%
22	84%	87%	77,6%
30	79%	82%	70,7%
50	64%	63%	56,2%

** Calculada por la tablas de "caida" de actividad del I^{125} .

TABLA n° 2 . VARIACION DEL PORCENTAJE DE INCORPORACION ISOTOPICA EN LOS MARCAJES DE HCT EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE CLORAMINA T Y DEL TIEMPO DE AGITACION.

CLORAMINA T (mg/ml)	TIEMPO DE AGITACION	INCORPORACION ISOTOPICA	ESTABILIDAD DEL TRAZADOR	"Daño 7 días".	"Daño" 14 días.
80	30 seg.	58%		15%	28%
50	30 "	55%		14%	29%
10	30 "	56%		12%	20%
1	30 "	52%		4%	8%
80	20 "	45%		16%	28%
80	10 "	25%		12%	22%
50	20 "	41%		13%	21%
50	10 "	26%		10%	19%
10	20 "	35%		11%	18%
10	10 "	23%		11%	19%
1	20 "	29%		5%	8%
1	10 "	18%		5%	7%

Puede deducirse de la tabla anterior que las condiciones óptimas de marcaje son en las que se utiliza una dilución de Cloramina T de 1 mg/ml y un tiempo de agitación de los elementos de marcaje de 30 segundos. En tales condiciones la fracción de "daño" a los 14 días es del 8% y a los 30 días del 15%. Sin embargo, y a pesar de que tal fracción pueda retirarse sencillamente por cromatografía en columna de Sephadex G-50, la sensibilidad de las curvas estándar desciende de forma significativa cuando el trazador lleva más de 25 días almacenado a -20°C . (Fig. 10).

Por otra parte puede comprobarse en la tabla n° 3 como el empleo de QUSO-G32 y la resina AG-1.X-10 no alteran la estabilidad e inmunorreactividad del trazador, aún retirando en un solo paso las fracciones de "daño" y de isótopo libre (Fig. 11)

TABLA n° 3 . COMPARACION DE LA ESTABILIDAD DE UN TRAZADOR OBTENIDO MEDIANTE EL EMPLEO DE QUSO-G32 Y DE LA RESINA CAMBIADORA DE ANIONES AG.1-X.10 , Y SIN SU UTILIZACION.

FRACCION DE "DAÑO" A LOS DIAS:	7	15	22	30	40
CON QUSO-G32 + RESINA:	8%	12%	17%	20%	27%
SIN QUSO-32 + RESINA:	10%	16%	20%	26%	30%

IV.1.b. CROMATOELECTROFORESIS.

En las figuras 1 , 2 y 3 se recogen los resultados de una cromatoelectroforesis en papel Wathman 3MM. Mientras la alícuota de HCT* permanece en el origen la alícuota de "daño" emigra entre ella y la de I.125 que avanza más lejos.

IV.1.c. ALBUMINA BOVINA (BSA) EN EL BUFFER ELUYENTE.

La emigración de las distintas fracciones en la cromatografía en Sephadex no se modifica por la presencia o ausencia de BSA en el buffer eluyente, (Fig. 4). Además, la radiactividad retenida en la columna es similar en ambos casos e inferior al 10%. La inmunoreactividad del "pico hormonal" tampoco se modifica por la incorporación de BSA al eluyente, (Fig. 5).

IV.1.d. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

La emigración a lo largo de una capa fina de aluminio-celulosa de una alícuota de HCT-fría y de HCT-I.125 se recoge en la Fig. 6 , pudiéndose ver como la HCT-fría, teñida con Ninhidrina emigra a la misma distancia que la HCT*.

IV.1.e. ANTICUERPOS ANTI-HCT.

Los dos tipos de AB utilizados en el RIA de HCT se titularon ensayando diluciones progresivas de los mismos frente a concentraciones conocidas de HCT comprendidas entre 0 y 10 ng/ml y con una cantidad invariable de trazador (8.000 cpm equivalentes aproximadamente a 15 pg). Los resultados se recogen en las Fig.12 y 13.

La especificidad de tales AB se estudió ensayándolos frente a Glucagon, Insulina y Gastrina en concentraciones conocidas. Puede observarse en las figuras 14a y 14b como no hay inmunoreactividad cruzada con ninguna de las sustancias estudiadas.

IV.1.f. INCUBACION DEL ENSAYO.

Empleando de entrada una técnica de saturación secuencial y admitiendo que tanto la HCT fría como la HCT* tienen idéntica inmunoreactividad, se estudió la duración óptima del ensayo para conseguir la máxima sensibilidad. Los resultados se recogen en la figura 15a-b, comprobándose como óptimos los tiempos de 3-4 y 2 días para las dos etapas del análisis.

IV.1.g. ESTABILIDAD DEL TRAZADOR.

Aunque el trazador utilizado en cada análisis puede considerarse puro al ser obtenido por cromatografía en Sephadex que lo separa de la "fracción dañada" y del isótopo libre, con su almacenamiento pierde inmunoreactividad; ello se traduce en una caída en la sensibilidad de las curvas standard, (Fig. 10).

IV.1.h. SEPARACION DE LAS FRACCIONES LIBRE Y LIGADA AL AB.

De los métodos utilizados para separar las fracciones libre y ligada fué el Carbón Activado el que permitió conseguir una mayor recuperabilidad (97%), menor adsor

ción inespecífica (6%) y menor variación entre resultados (5%).

Frente al Carbón Activado, el Polietilenglicol y el Dioxano daban recuperaciones del 88 y 89% respectivamente, mayores adsorciones inespecíficas (10%) y menor reproducibilidad (22% de variación).

IV.1.i. CURVAS ESTANDARD.

En las tablas 4 y 5 se hallan recogidos los resultados experimentales de una serie de diez curvas estándar. En la tabla 5 se relaciona el $\%B/B_0$ con concentraciones de hormona fría, y en la figura 7 se representa gráficamente.

En la figura 8 se muestra la hipérbola de ecuación $(y - 0,458)(x + 1,1698) = 4,772$ en la que matemáticamente, siguiendo a Tamarit (381), se ha transformado la curva de la figura 7. Finalmente, en la figura 9 se representa la recta que relaciona concentraciones de hormona fría (abscisas) con $1/\text{cpm } B-N \times 10^{-3}$ en ordenadas.

El cálculo de la concentración hormonal en una muestra puede hacerse sobre la curva estándar trazada según los resultados experimentales, o calcularse a partir de las ecuaciones de la hipérbola o de la recta. Sistemáticamente el cálculo se hace sobre la ecuación de la hipérbola.

La sensibilidad (S_0) o mínima cantidad hormonal detectable es según los datos experimentales de 50 pg/ml. Sin embargo, la sensibilidad obtenida matemáticamente a partir de la ecuación (381) $S_0 = 0,01b(1+ab/K)$ es de 24 ± 5 pg/ml.

El error experimental (E_e) deducido de la ecuación: $E_e = dx = -Kdy/(y-N)^2$, siendo dy el coeficiente de variación de las cpm medidas en el triplicado de cualquier punto de la curva, y N las cpm del "binding" inespecífico, es en todas las curvas estándar inferior al 12%.

TABLA 4 . RESULTADOS EXPERIMENTALES DE DIEZ CURVAS ESTANDARD EN FORMA DE cpm FRENTE A H

T cpm	N cpm	0	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00	2,50	5,00 (HCT-F,ng/ml)
10577	560	4343	4259	4101	3722	3304	3110	2901	2199	1260 cpm B
7099	365	3145	3098	2993	2702	2488	2303	2166	1550	892
9650	410	3864	3829	3626	3412	2969	2804	2517	1909	1208
10225	498	4462	4339	4117	3745	3372	3134	2952	2032	1283
9860	405	4530	4410	4142	3808	3441	3313	3024	2051	1251
8650	436	4035	3934	3693	3434	3168	2876	2610	1912	1239
10050	525	4783	4686	4444	4120	3810	3423	3150	2325	1627
10660	565	4831	4771	4562	4191	3735	3487	3210	2199	1260
8440	415	4060	3914	3739	3418	3196	2832	2642	1793	1067
7985	406	3683	3549	3378	3175	2880	2621	2382	1668	1061
$\bar{X} =$ 8337	458	4174	4079	3879	3573	3236	2990	2755	1964	1215

TABLA 5 . CURVAS ESTANDARD EN FORMA DE %B/B₀ FRENTE A CONCENTRACIONES DE HCT.

HCT fria (ng/ml):	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00	2,50	5,00
%B/B ₀ =								
	97,80	93,6	83,6	72,5	67,4	61,9	43,3	18,5
	98,30	94,5	84,1	76,4	69,7	64,8	42,6	18,9
	99,00	93,1	86,9	74,1	69,3	61,0	43,4	23,1
	97,10	90,6	82,5	73,6	70,5	63,5	39,9	20,5
	96,90	91,3	81,9	72,5	66,5	61,9	38,7	19,8
	97,21	90,5	83,3	75,9	67,8	60,4	41,0	22,3
	97,80	92,1	84,5	77,2	68,1	61,7	42,3	25,9
	98,60	93,7	85,0	74,3	68,5	62,0	38,3	16,3
	96,00	91,2	82,4	76,3	66,3	61,1	37,8	17,9
	96,90	90,7	84,5	75,5	67,6	60,3	38,5	20,0
\bar{X} =	97,46	92,1	83,9	74,8	64,2	61,9	40,6	20,3
D.S.=	1,037	1,48	1,47	1,66	1,35	1,38	2,20	2,79
E.S.=	0,330	0,47	0,47	0,53	0,43	0,44	0,70	0,88
C.V.=	0,011	0,016	0,017	0,022	0,019	0,022	0,055	0,137

IV.1.j. REPRODUCIBILIDAD INTRA-ANÁLISIS DE LAS CURVAS ESTÁNDAR.

Los resultados en forma de %B/B₀ de cinco curvas estándar realizadas en un mismo análisis se recogen seguidamente.

HCT fría (ng/ml)

	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00	2,50	5,00
	96,7	90,0	84,3	76,5	68,1	63,0	38,9	22,3 %
	98,4	93,1	85,9	78,3	70,2	62,5	42,1	17,5
	99,0	93,9	86,7	79,0	71,4	64,3	44,0	24,1
	96,8	89,8	84,0	72,4	67,5	62,3	39,6	22,5
	97,3	91,5	82,7	71,6	65,3	60,0	41,3	20,7
\bar{X} =	97,6	91,6	84,7	75,5	68,5	62,4	41,1	21,4
D.S=	1,01	1,82	1,58	3,38	2,38	1,56	2,18	2,50
E.S=	0,45	0,81	0,71	1,51	1,06	0,69	0,97	1,11
C.V=	0,010	0,019	0,018	0,044	0,034	0,025	0,053	0,116

IV.1.k. PARALELISMO BUFFER-SUERO SIN CALCITONINA.

Para valorar la posible interferencia de las proteínas y demás componentes del suero en la reacción HCT-AB, se realizaron curvas estándar en las que se introducía un volumen de 0,1 ml de suero sin HCT en lugar de buffer. En la figura 16 se observa el paralelismo existente entre curvas estándar que recibieron 0,1 ml de buffer ó 0,1 ml de suero tratado con QUSO-G32 y las curvas estándar patrón:

IV.1.1. PARALELISMO ENTRE DILUCIONES.

Otra forma de apreciar posibles efectos inespecíficos del suero es estudiar el paralelismo entre las concentraciones de la proteína en diluciones sucesivas del mismo suero. Por las bajas concentraciones de HCT en sueros normales fué preciso realizar esta experiencia en sueros con un contenido patológicamente elevado de HCT.

Los resultados se describen numéricamente a continuación y de forma gráfica en la figura 17 .

PARALELISMO ENTRE DILUCIONES.

<u>Suero Completo</u>	<u>1/2</u>	<u>1/5</u>	<u>1/10</u>	<u>1/20</u>	<u>1/40</u>
82.600 pg/ml	45.400	21.100	9.400	3.900	1.550
114.800 "	65.200	26.300	9.100	6.300	2.370
71.300 "	43.500	16.200	6.200	2.560	1.720
46.900 "	20.100	10.500	4.300	2.500	850

Los coeficientes de correlación entre dilución y contenido hormonal son para cada caso:

0.996, 0.998, 0.998 y 0.997.

IV.1.m. RECUPERACION DE HORMONA FRIA.

Este parámetro de fiabilidad del RIA se estudió añadiendo concentraciones conocidas de hormona a un suero previamente valorado. Los resultados se recogen seguidamente.

a):

HCT en suero: 340 ± 54 pg/ml (desviación estándar intra-análisis, n=10).

HCT añadida: 500 pg/ml.

HCT recuperada (pg/ml):

905, 850, 760, 750 y 860. $\bar{X} = 825$ pg/ml, (98,2%).

b):

HCT en suero: 340 ± 54 pg/ml.

HCT añadida: 1.000 pg/ml.

HCT recuperada (pg/ml):

1215, 1405, 1310, 1280, 1290. $\bar{X} = 1.300$ pg/ml, (97,0%).

IV.1.n. REPRODUCIBILIDAD INTRA-ANALISIS PARA SUEROS.

Uno de los parámetros de fiabilidad de un RIA es el de la variación de un resultado (contenido hormonal de una muestra) dentro de un mismo análisis al ensayar simultáneamente varias alícuotas del mismo suero. Este estudio se llevó a cabo ensayando diez sueros por decuplicado en un mismo análisis. Los resultados se recogen a continuación.

Suero:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	420	280	350	310	630	420	210	290	320	480	pg/ml
	360	210	320	405	530	430	290	305	275	425	
	315	290	380	290	490	460	220	335	340	450	
	435	330	415	295	610	390	205	270	310	490	
	400	220	345	430	620	385	265	295	295	505	
	365	290	380	305	650	445	230	310	285	475	
	410	300	350	340	490	390	270	270	365	440	
	350	250	370	410	495	385	265	325	290	510	
	380	270	440	290	605	410	250	305	360	460	
	425	240	390	330	535	430	240	260	290	485	
$\bar{X}=$	386	268	371	340	565	414	244	296	313	473	pg/ml
D.S=	39	38	39	54	64	27	28	25	32	28	pg/ml
E.S=	12	12	12	17	20	8	9	8	10	9	
C.V=	10	14	11	16	11	6	11	8	10	6	%

IV.1.ñ. REPRODUCIBILIDAD INTER-ANALISIS PARA SUEROS.

Se estudió ensayando en cinco análisis sucesivos ocho sueros distintos obteniéndose los siguientes resultados.

Suero:	1	2	3	4	5	6	7	8
HCT(pg/ml)	940	460	525	265	415	250	265	380
	810	490	605	305	480	240	300	315
	1.050	540	410	230	370	290	285	440
	1.160	560	460	350	505	265	240	415
	815	410	475	310	395	325	205	370
$\bar{X}=$	955	492	495	292	433	274	259	384
D.S=	151	61	74	46	57	34	38	48
(%) C.V=	16	12	15	16	13	12	14	12

IV.2. NIVELES BASALES NORMALES DE HCT.

Se consideraron dos grupos de controles normales; el primero comprendía 25 individuos sanos de edades comprendidas entre 20 y 38 años ($\bar{X}=23$), y el segundo se componía de 75 personas afectas de distintas patologías no óseas, neoplásicas, endocrinas, ni insuficientes renales en las que directa o indirectamente podían hallarse anómalamente elevados los niveles basales de HCT. La media de edad de este segundo grupo era de 41 años (29-59).

Los resultados obtenidos junto con los de varios iones medidos paralelamente fueron:

GRUPO I:

	HCT pg/ml	Ca mg %	P mg %	Na mEq/l	K mEq/l	Cl mEq/l
1	360	8,3	4,5	138	4,2	98
2	125	8,8	4,3	139	3,9	101
3	150	7,5	5,1	136	4,0	104
4	75	7,9	3,9	136	4,4	99
5	355	8,4	3,8	142	4,6	100
6	405	8,2	4,0	141	4,3	101
7	160	7,6	3,9	142	4,9	101
8	Tr	9,0	4,6	138	3,9	99
9	195	8,4	4,9	140	4,6	102
10	Tr	9,3	4,3	141	4,8	102
11	235	9,1	5,0	139	4,7	94
12	290	8,8	3,8	140	5,0	106
13	105	8,4	4,5	137	3,9	103
14	190	7,9	3,1	139	4,2	104
15	380	7,8	3,4	143	4,8	101
16	385	9,2	4,3	136	4,0	95
17	410	9,4	3,2	144	3,9	103
18	195	9,0	4,6	142	4,2	105
19	200	8,7	5,0	135	4,2	99
20	195	10,1	4,2	140	4,2	100
21	380	9,6	3,9	145	4,7	103
22	105	9,4	4,8	141	3,9	93
23	155	8,7	4,9	140	4,5	98
24	295	7,9	3,6	143	4,0	93
25	410	8,6	4,1	138	4,6	99

\bar{X} : 226 8,64 4,23 139,8 4,34 100,1
D.S.: 143 0,67 0,57 2,66 0,36 3,55

r HCT/Ca= -0,01. r HCT/P= -0,436. r HCT/Ca:P = 0,416.

r HCT/Na= 0,34. r HCT/K= 0,181. r HCT/Cl= -0,03.

GRUPO II.

	HCT pg/ml	Ca mg %	P mg %	Na mEq/l	K mEq/l	Cl mEq/l
1	250	8,9	4,5	137	3,8	102
2	455	8,2	3,9	145	4,3	101
3	370	9,6	4,3	143	4,0	97
4	110	9,3	4,6	141	3,6	98
5	Tr	8,5	4,8	136	3,5	103
6	55	8,6	4,0	139	3,6	95
7	190	9,5	3,6	139	3,8	105
8	Tr	9,4	3,1	143	4,2	93
9	405	7,9	3,3	142	4,1	102
10	310	8,2	4,4	140	3,9	101
11	305	8,0	3,1	138	3,8	92
12	445	9,1	4,4	135	4,4	104
13	315	8,6	4,8	143	4,6	100
14	Tr	7,8	3,8	141	4,3	103
15	305	8,0	4,1	143	4,0	98
16	185	8,3	3,0	138	3,7	94
17	110	9,4	4,4	140	4,7	101
18	125	8,6	4,9	137	4,4	100
19	215	9,3	4,3	136	4,1	108
20	275	8,1	5,0	139	3,9	96
21	105	7,9	3,8	144	4,3	104
22	190	8,1	4,1	143	4,6	105
23	75	9,7	5,2	141	4,1	99
24	350	8,5	4,0	144	3,6	100
25	215	8,3	3,7	138	3,9	101
26	295	9,5	4,5	140	3,8	99
27	125	8,8	3,6	144	4,1	104
28	310	7,8	4,8	141	4,3	93
29	Tr	9,3	4,2	143	4,0	105
30	385	8,0	5,1	138	3,5	101
31	125	8,1	4,6	137	3,8	100
32	305	9,0	3,7	140	4,2	98
33	210	8,6	4,9	139	4,5	99
34	290	8,3	4,2	140	5,0	99
35	205	9,8	4,6	143	3,8	103
36	370	8,3	4,9	141	4,4	105
37	325	8,5	3,5	137	4,9	101
38	305	7,9	3,1	138	4,7	98
39	125	8,1	4,7	138	4,5	96
40	110	8,5	3,4	144	4,7	102
41	275	7,8	3,6	140	3,9	100
42	405	8,1	4,0	138	4,0	97
43	370	9,3	3,7	137	4,4	97
44	Tr	8,6	4,8	140	4,1	99
45	285	8,0	4,1	139	4,6	93
46	215	9,3	3,5	141	4,2	102
47	305	8,7	4,5	144	4,8	99
48	Tr	9,2	4,1	140	4,5	106
49	170	9,0	4,4	138	3,9	101
50	395	8,0	3,4	138	3,9	97

...

GRUPO II (Continuación).

	<u>HCT</u> pg/ml	<u>Ca</u> mg %	<u>P</u> mg %	<u>Na</u> mEq/l	<u>K</u> mEq/l	<u>Cl</u> mEq/l
51	175	9,0	3,8	139	4,1	99
52	205	8,6	4,5	143	4,3	103
53	110	8,1	4,4	137	3,9	106
54	Tr	9,3	4,8	141	3,8	95
55	195	8,2	4,9	143	4,4	99
56	270	9,1	4,0	142	4,0	102
57	415	8,0	3,1	140	4,0	100
58	190	8,3	3,8	139	3,8	100
59	405	7,9	4,3	138	3,9	106
60	175	8,5	4,0	142	3,7	99
61	230	8,3	4,1	141	4,5	99
62	195	9,1	3,9	135	4,5	101
63	270	8,8	4,5	140	3,5	103
64	320	8,7	4,1	134	4,1	102
65	405	8,2	4,3	138	3,5	98
66	325	9,3	3,8	145	4,3	104
67	120	9,0	4,5	136	4,8	98
68	195	8,5	4,0	140	4,3	107
69	210	8,4	3,9	139	3,5	93
70	160	7,9	3,7	141	3,9	99
71	70	8,2	4,4	141	4,3	102
72	115	8,0	3,8	138	4,5	105
73	60	8,8	4,5	140	4,8	99
74	210	9,1	4,3	144	4,0	99
75	250	8,0	4,7	144	4,5	102

\bar{X} : 221 8,58 4,15 140,0 4,14 100,2
 D.S: 123 0,55 0,53 2,62 0,38 3,54
 $r \text{ HCT/Ca} = -0,16.$ $r \text{ HCT/P} = -0,13.$ $r \text{ HCT/Ca:P} = -0,210.$
 $r \text{ HCT/Na} = -0,048.$ $r \text{ HCT/K} = 0,010.$ $r \text{ HCT/Cl} = -0,068.$

En el grupo I el número de casos en los que se hallaron niveles indetectables de HCT fué de dos, y en el grupo II, de siete, con lo que en el total de cien controles la HCT indetectable fué del 9 %.

Considerando en conjunto a los dos grupos el nivel medio basal de HCT es de 223 ± 124 pg/ml.

En el grupo I (25 casos) la HCT basal encontrada en mujeres (N=11) fué de 226 ± 143 pg/ml, sin diferencia significativa con el observado en hombres (N=14) de 233 ± 123 pg/ml. Tampoco en el grupo II se halló diferencia

significativa entre los valores basales de HCT encontrados en mujeres (N=39), 224 ± 128 pg/ml, y en varones (N=36), 217 ± 118 pg/ml.

La correlación entre HCT y los iones séricos medidos paralelamente no es estadísticamente significativa.

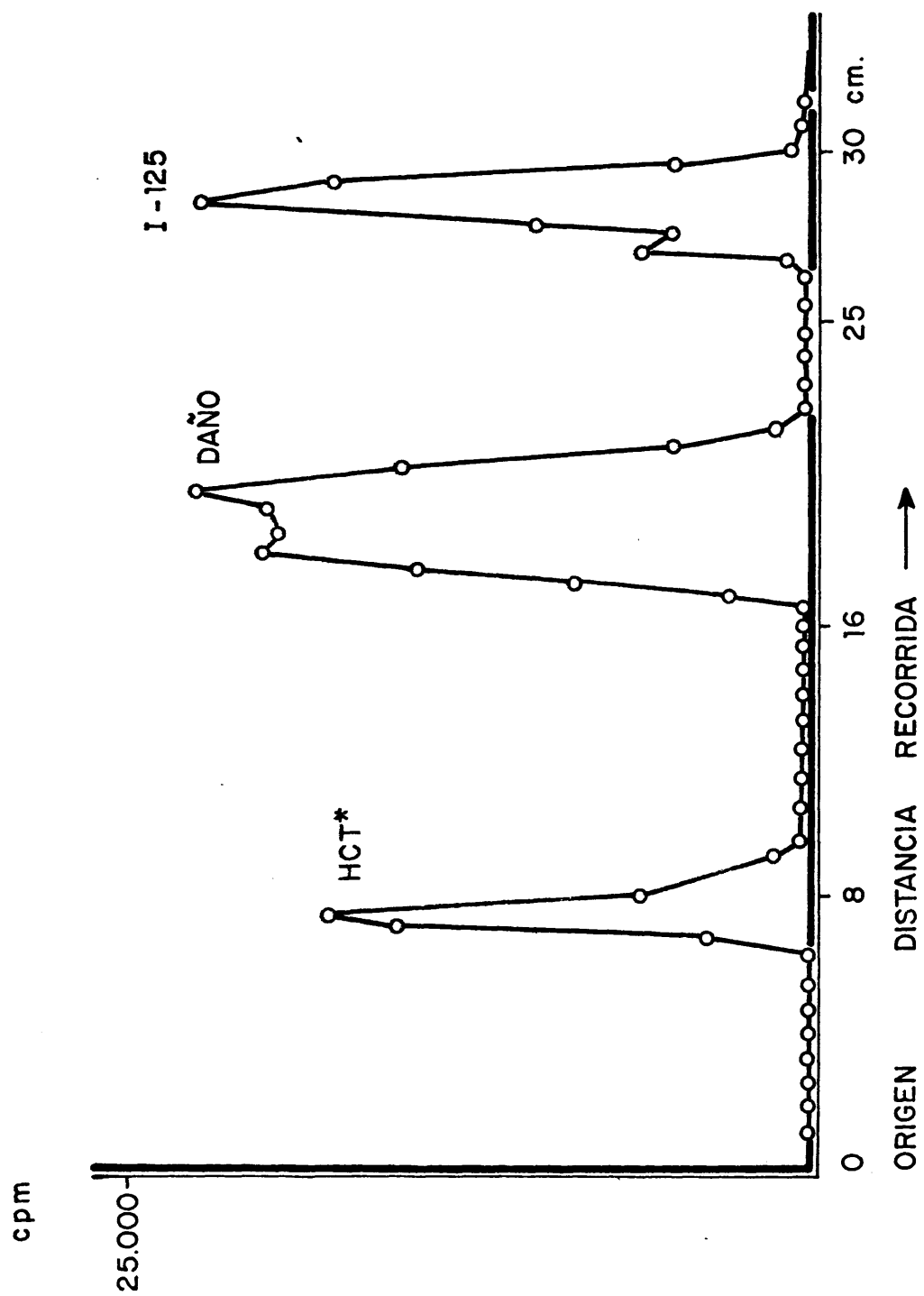


FIG. 1 - CROMATOELECTROFORESIS DE UNO ALICUOTA DE HCT* SIN PURIFICAR. EN WATHMAN 3 MM.

FIG. 2 - CROMATOELECTROFORESIS EN WATHMAN
3 MM DE UNA ALICUOTA DE HCT *
PURIFICADA.

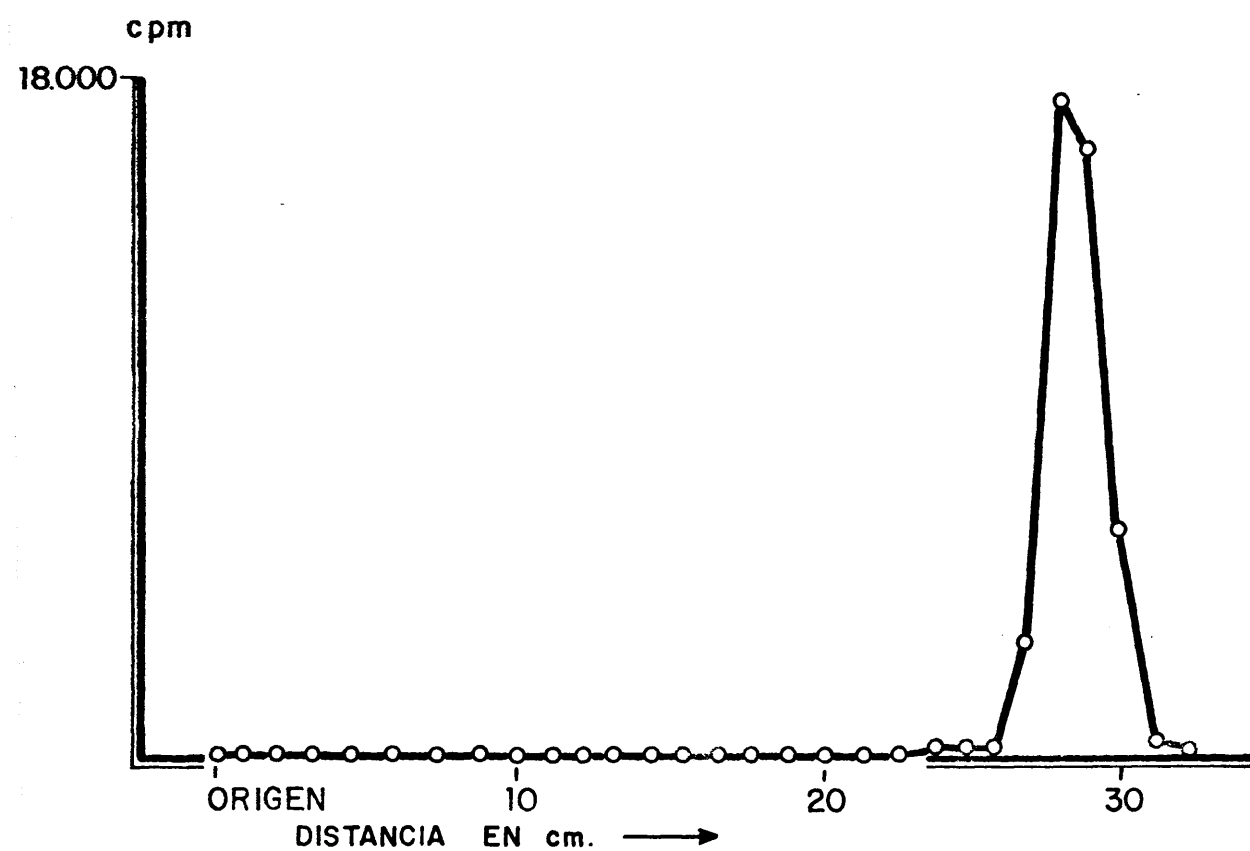
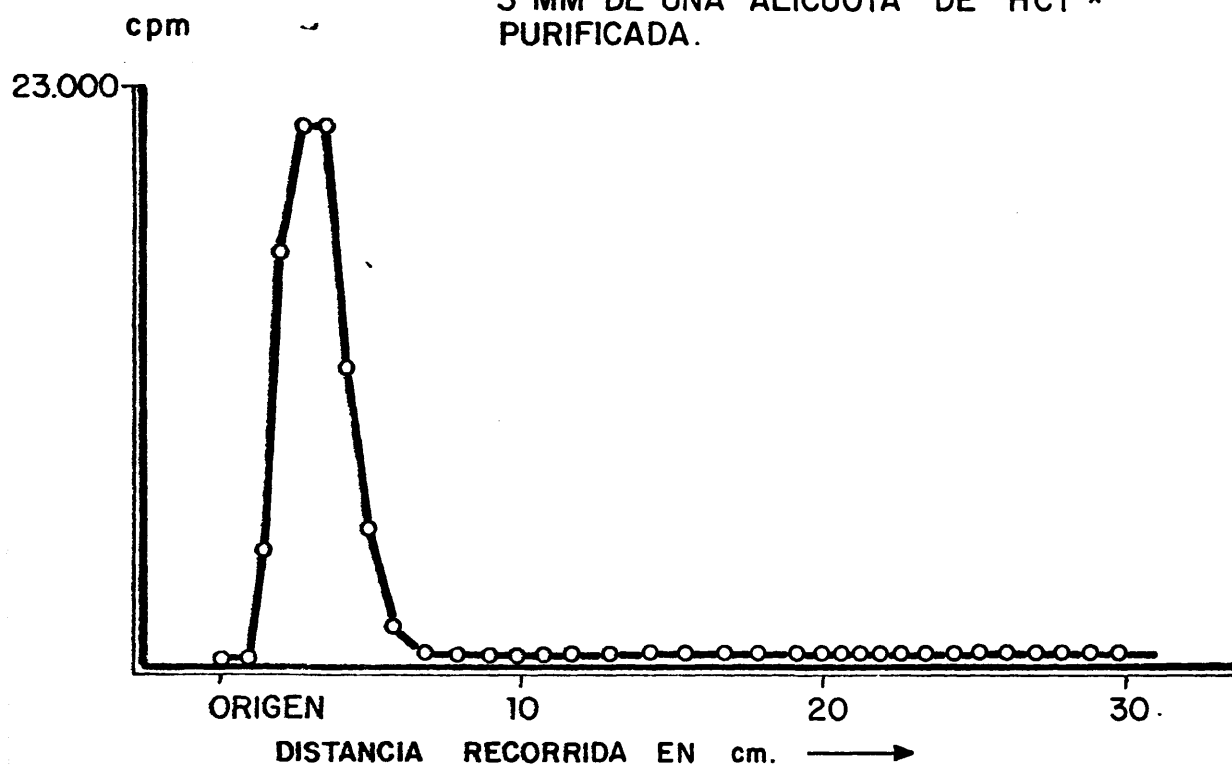


FIG. 3 - CROMATOELECTROFORESIS EN PAPEL WATHMAN 3 M.M.
DE UNA ALICUOTA DE I - 125.

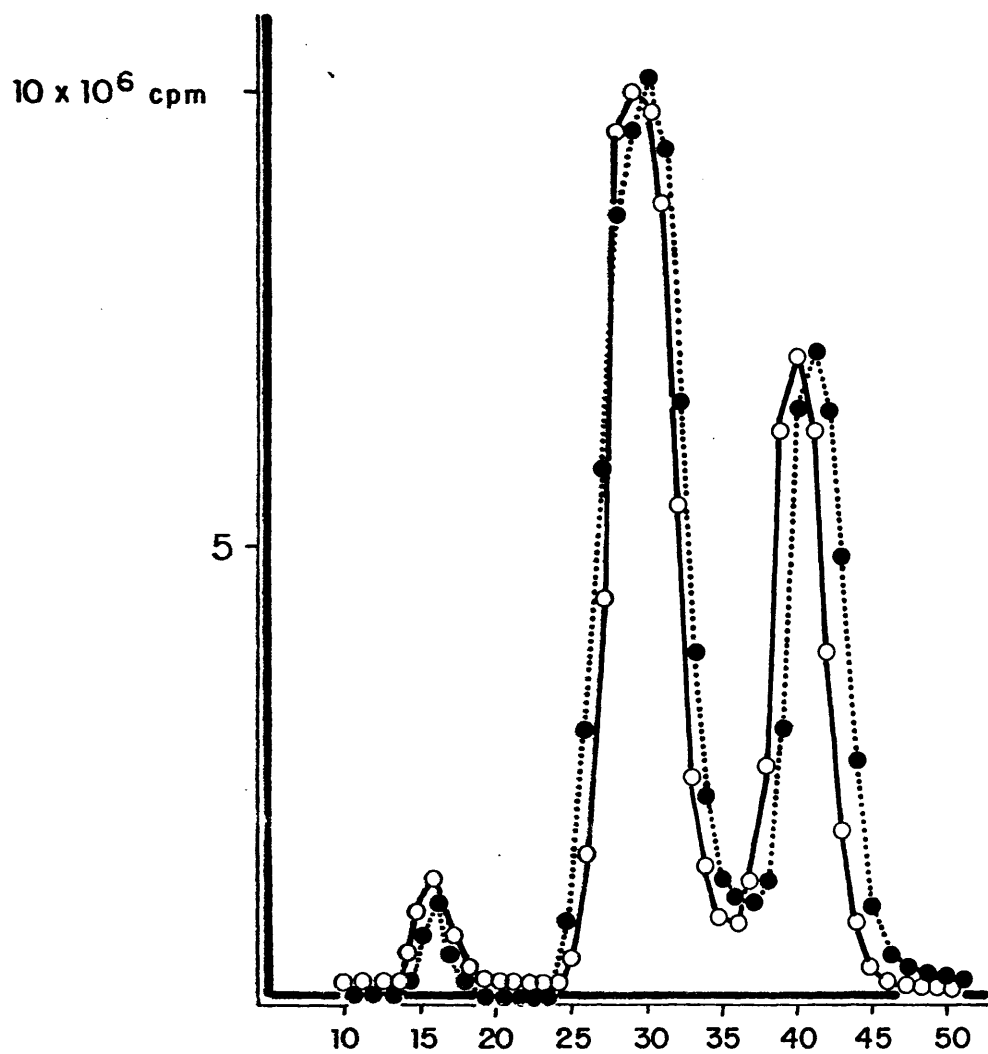


FIG. 4 - PURIFICACION EN SEPHADEX G-50
 ○— BUFFER ELUYENTE SIN ALBUMINA
 ●— BUFFER ELUYENTE CON ALBUMINA

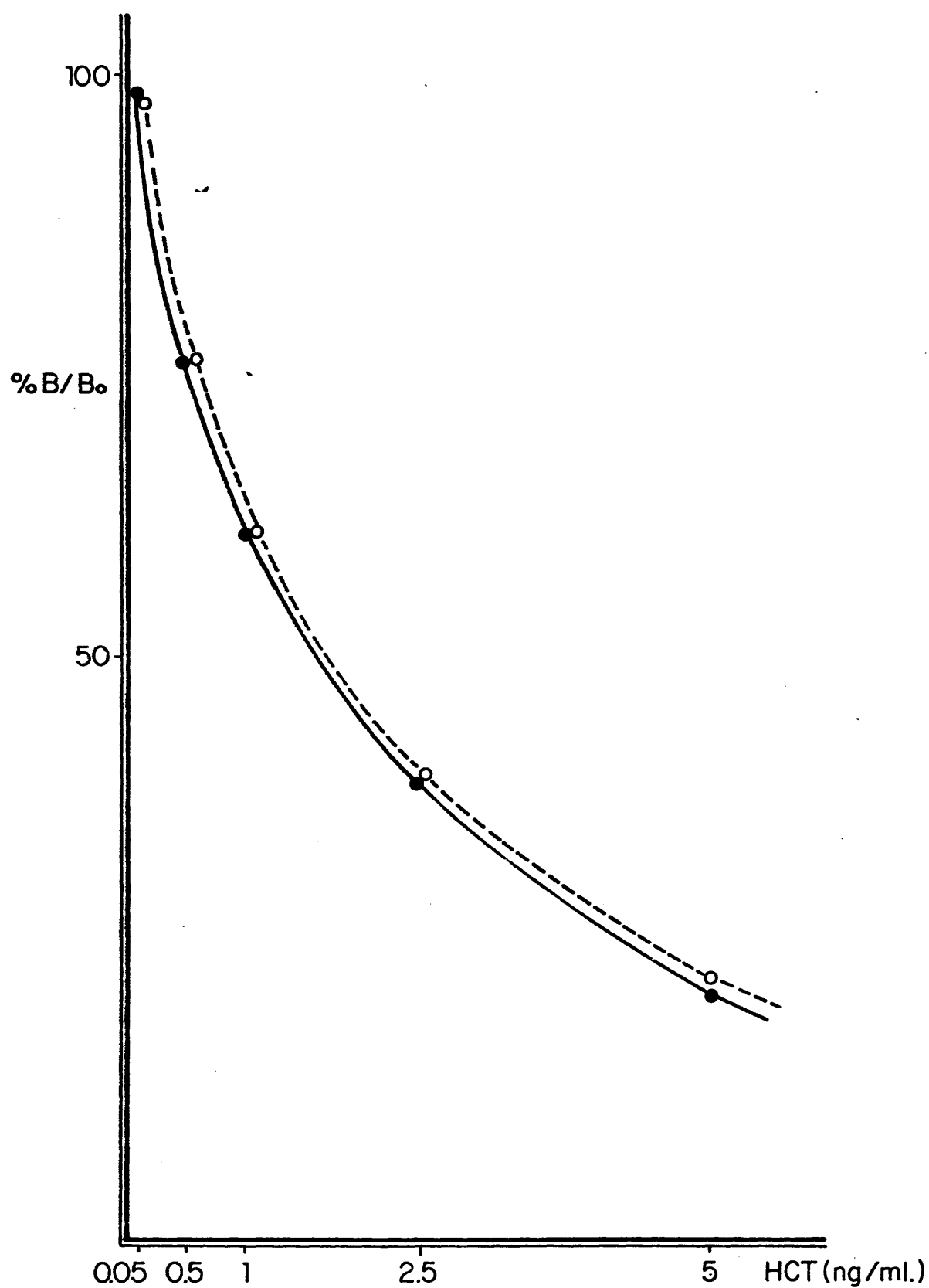


FIG. 5 - ESTUDIO DE LA INMUNOREACTIVIDAD DEL PICO HORMONAL OBTENIDO POR PURIFICACION EN SEPHADEX G-50.

●—● EL BUFFER FLUYENTE NO CONTENIA BSA.
 ○--○ " " " " CONTENIA BSA (0.2%)

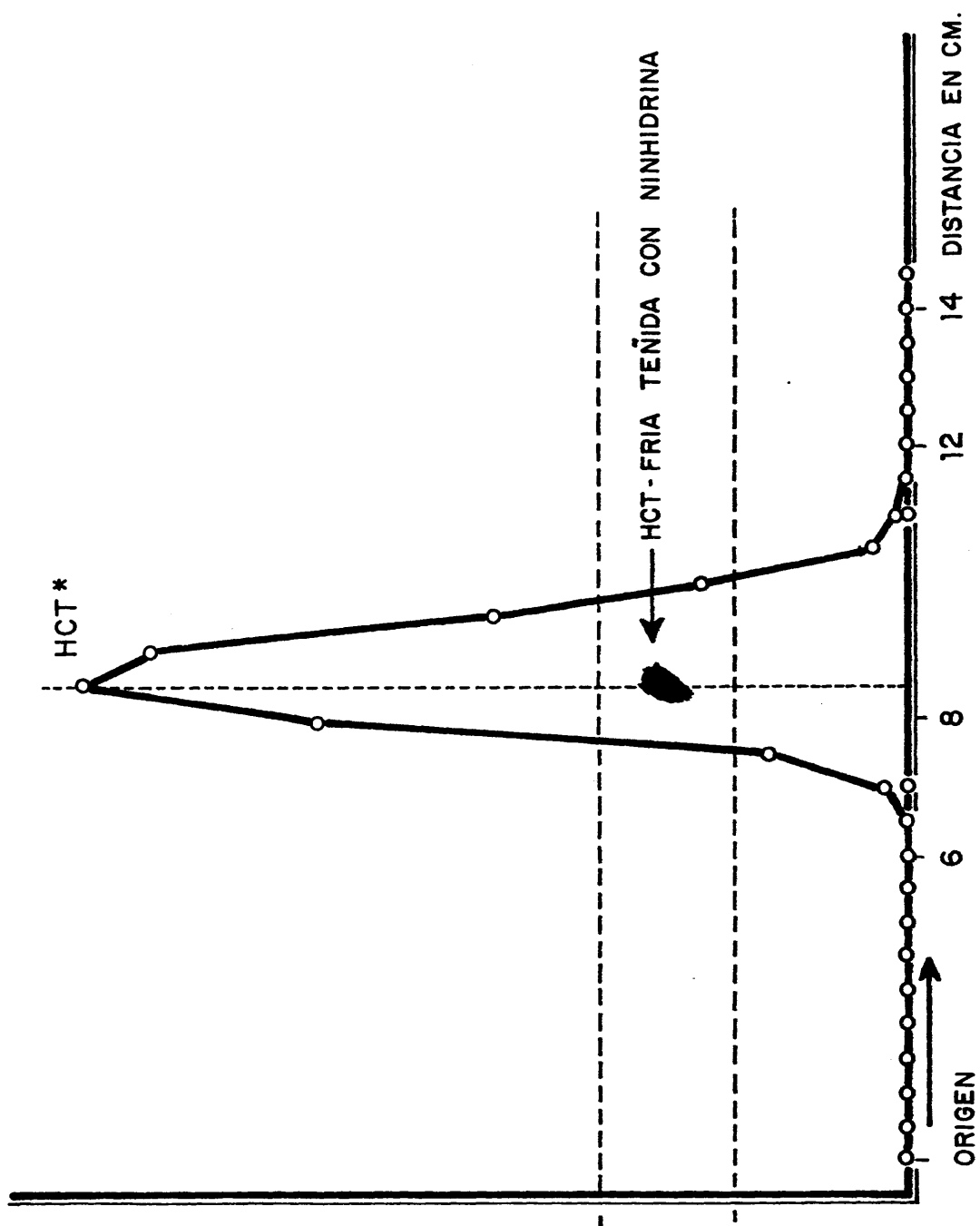


FIG. 6 - CROMATOGRAMA EN CAPA FINA. LA HCT* Y LA HCT-FRIA EMIGRAN A LA MISMA DISTANCIA.

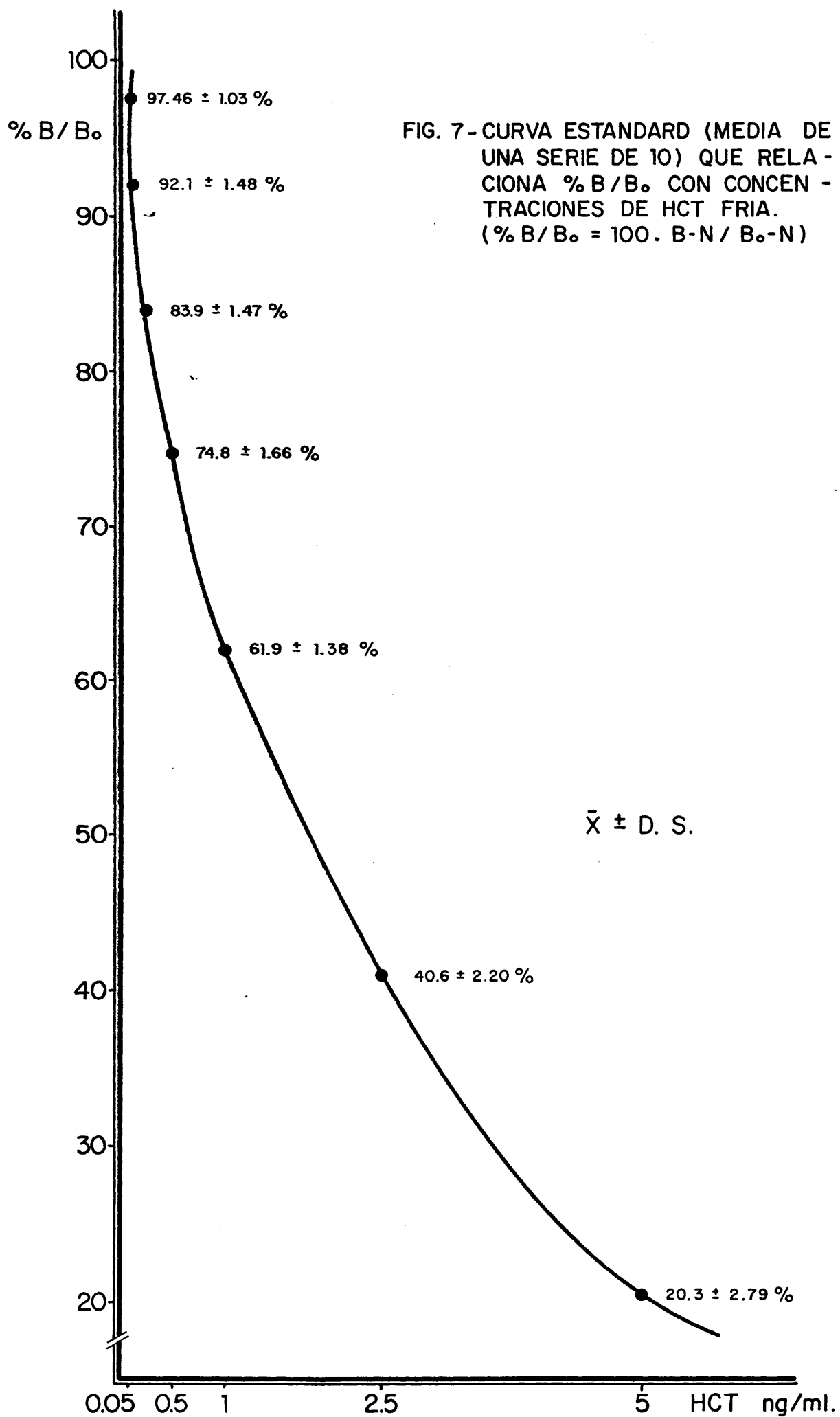
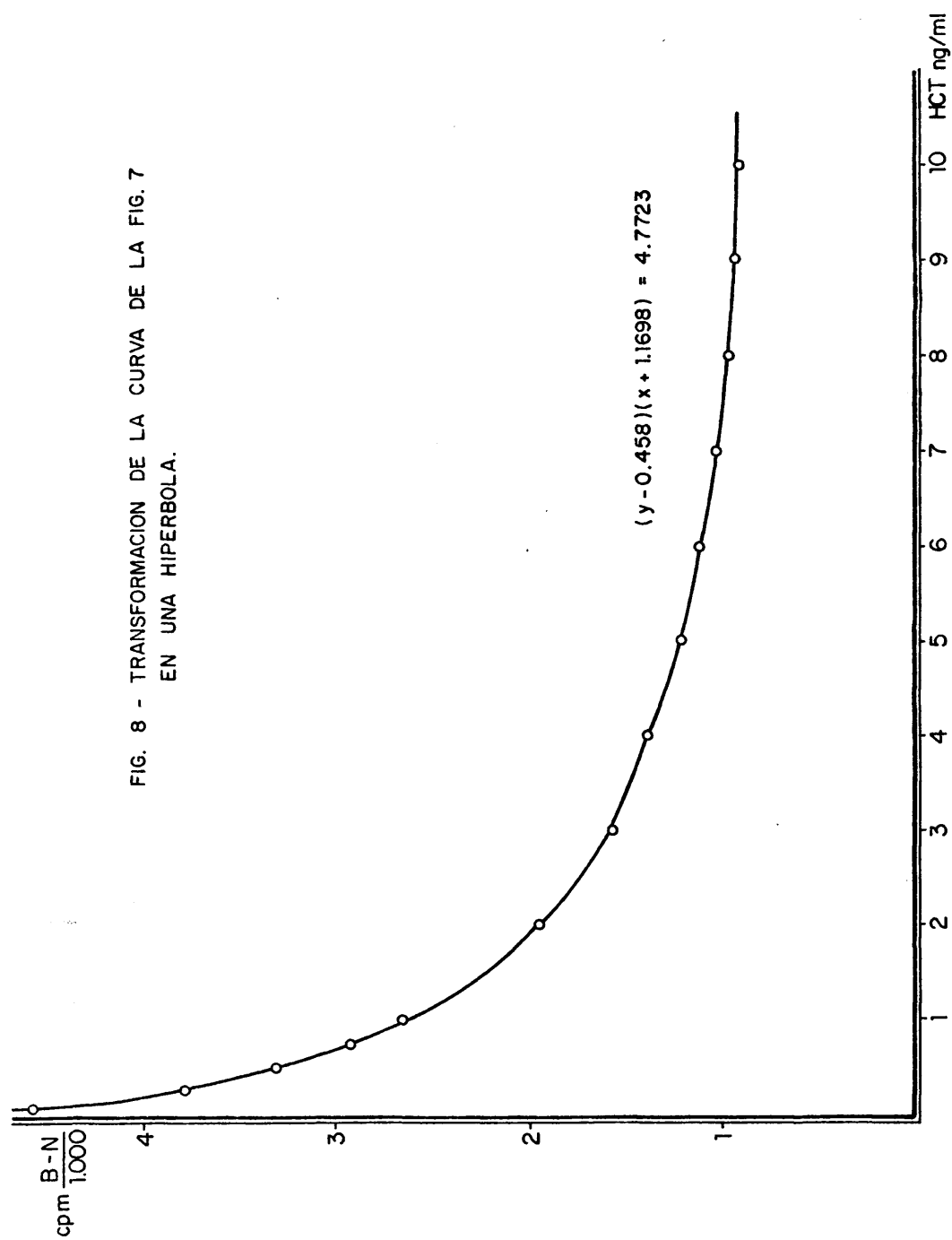


FIG. 8 - TRANSFORMACION DE LA CURVA DE LA FIG. 7
EN UNA HIPERBOLA.



4

$$1 / \left(\frac{\text{cpm B-N}}{1000} \right)$$

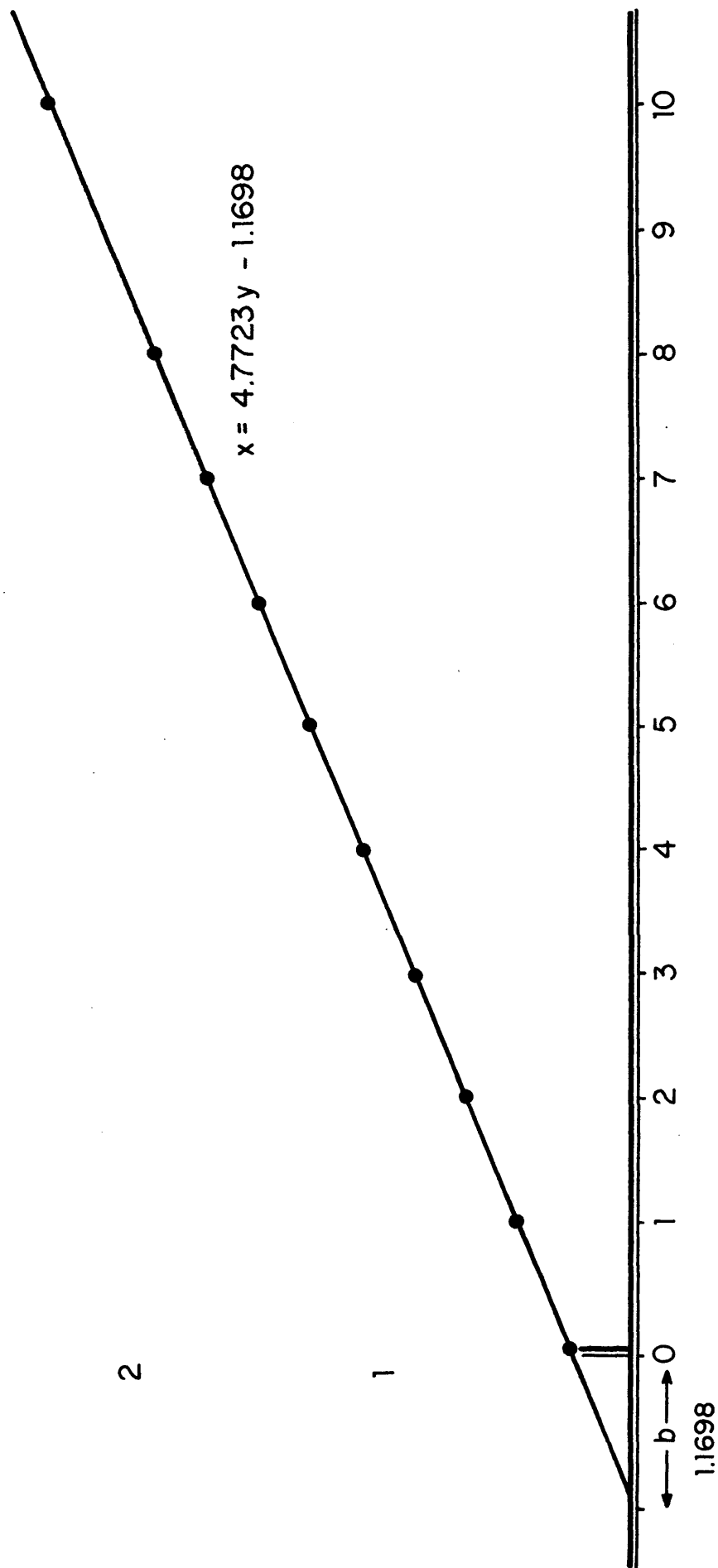
3

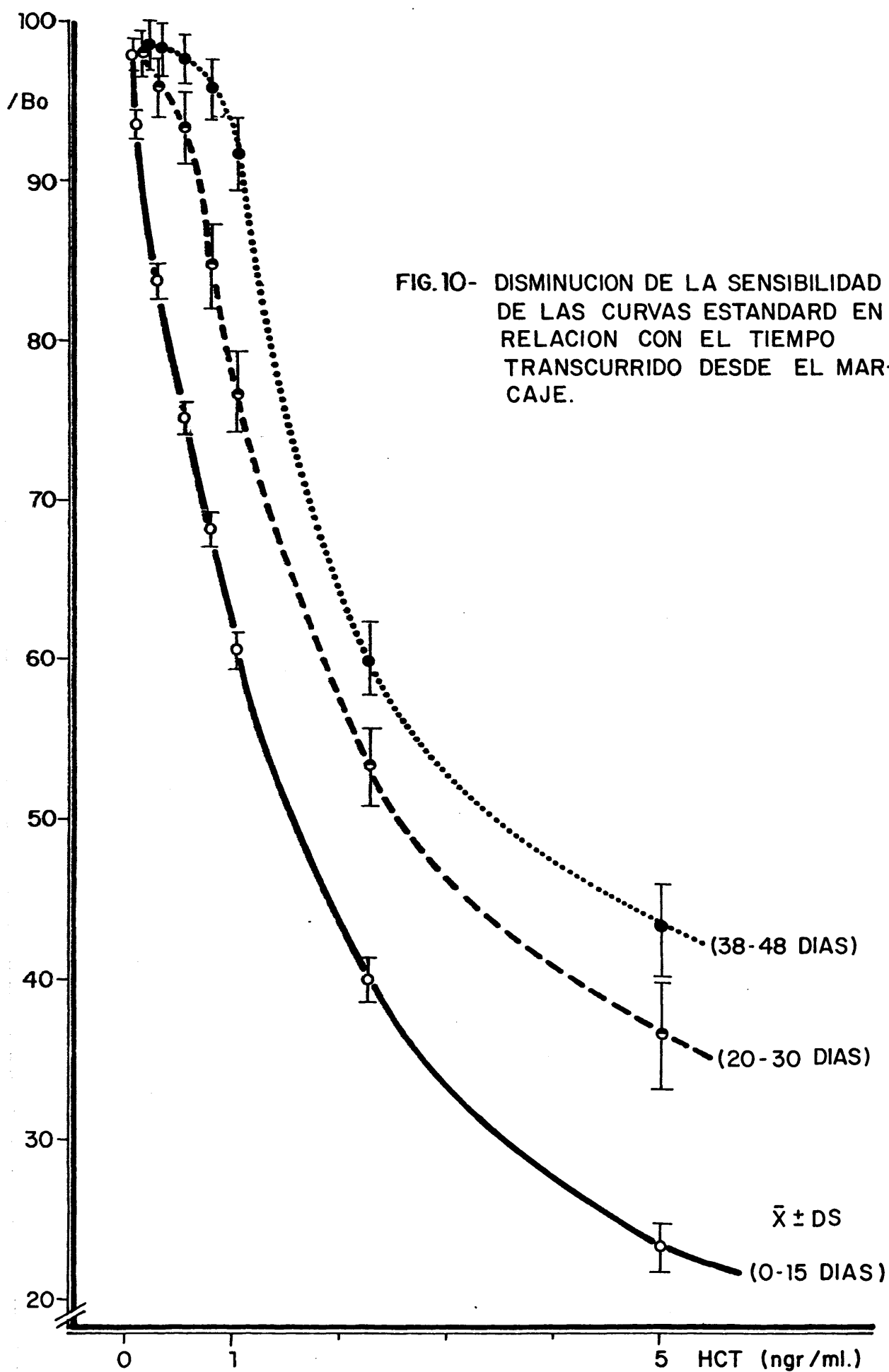
2

1

FIG. 9 - LINEARIZACION DE LA HIPERBOLA: $(y - 0.458)(x + 1.1698) = 4.7723$
POR EL METODO DE LOS RECIPROCOS.

COEFICIENTE DE CORRELACION: $r = 0.978$





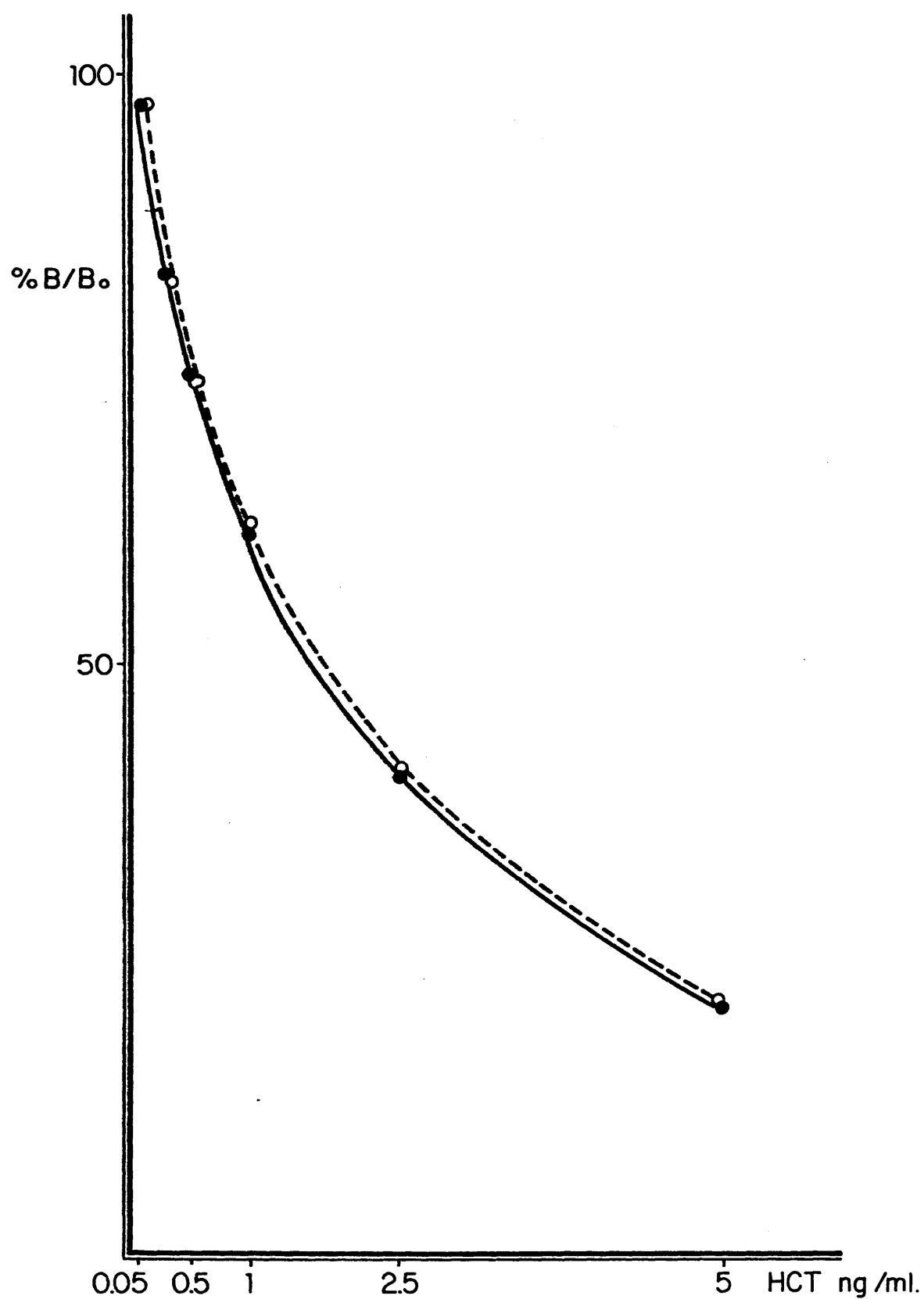


FIG. 11 - ●—● CURVA ESTANDARD CON UN TRAZADOR OBTENIDO CON ADSORCION POR QUSO - G 32.

○---○ CURVA ESTANDARD CON UN TRAZADOR NO ADSORBIDO POR QUSO.

% B / T

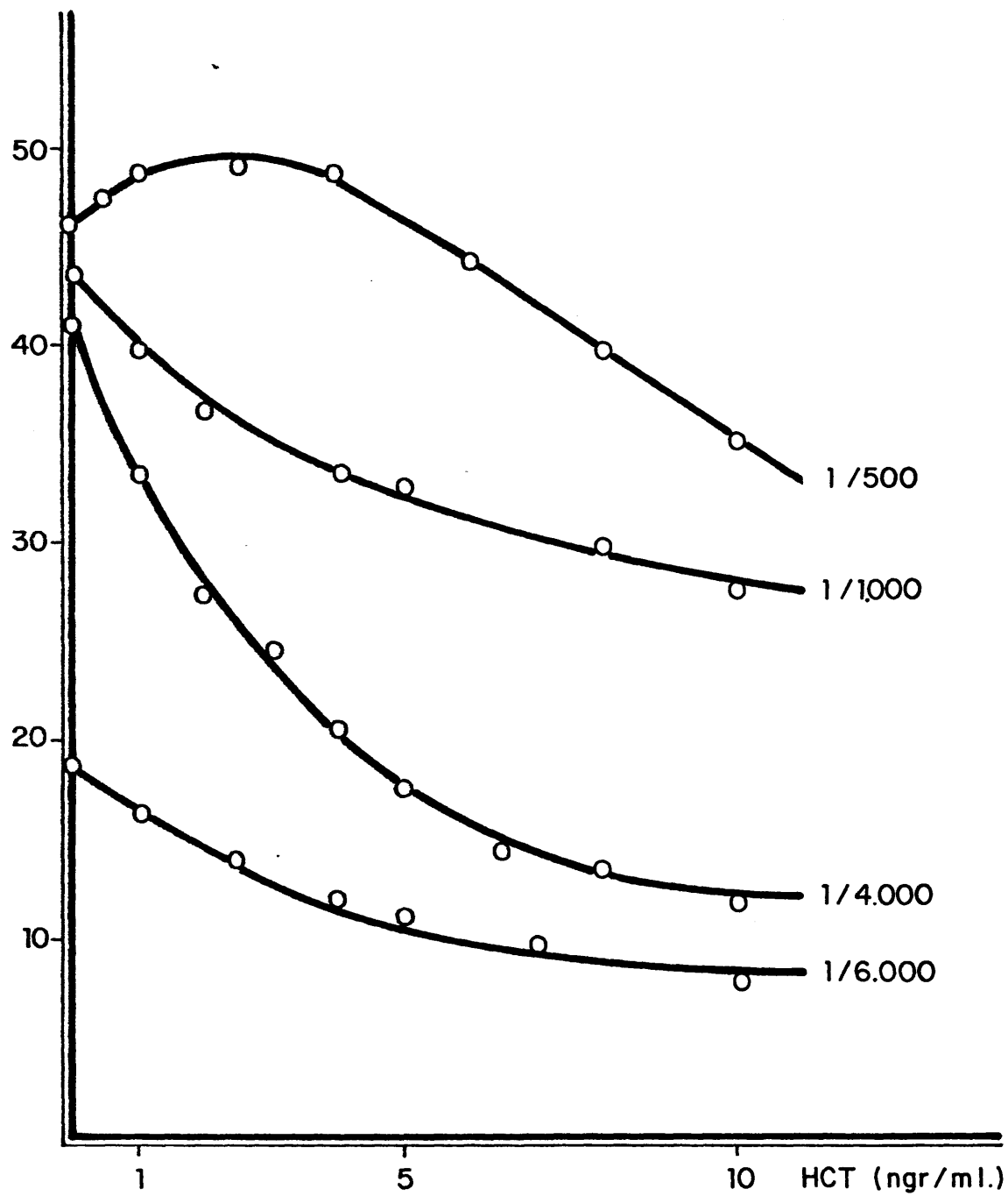


FIG. 12 - TITULACION DEL AB ANTI - HCT. (AB-I), DE CALBIOCHEM A.G.

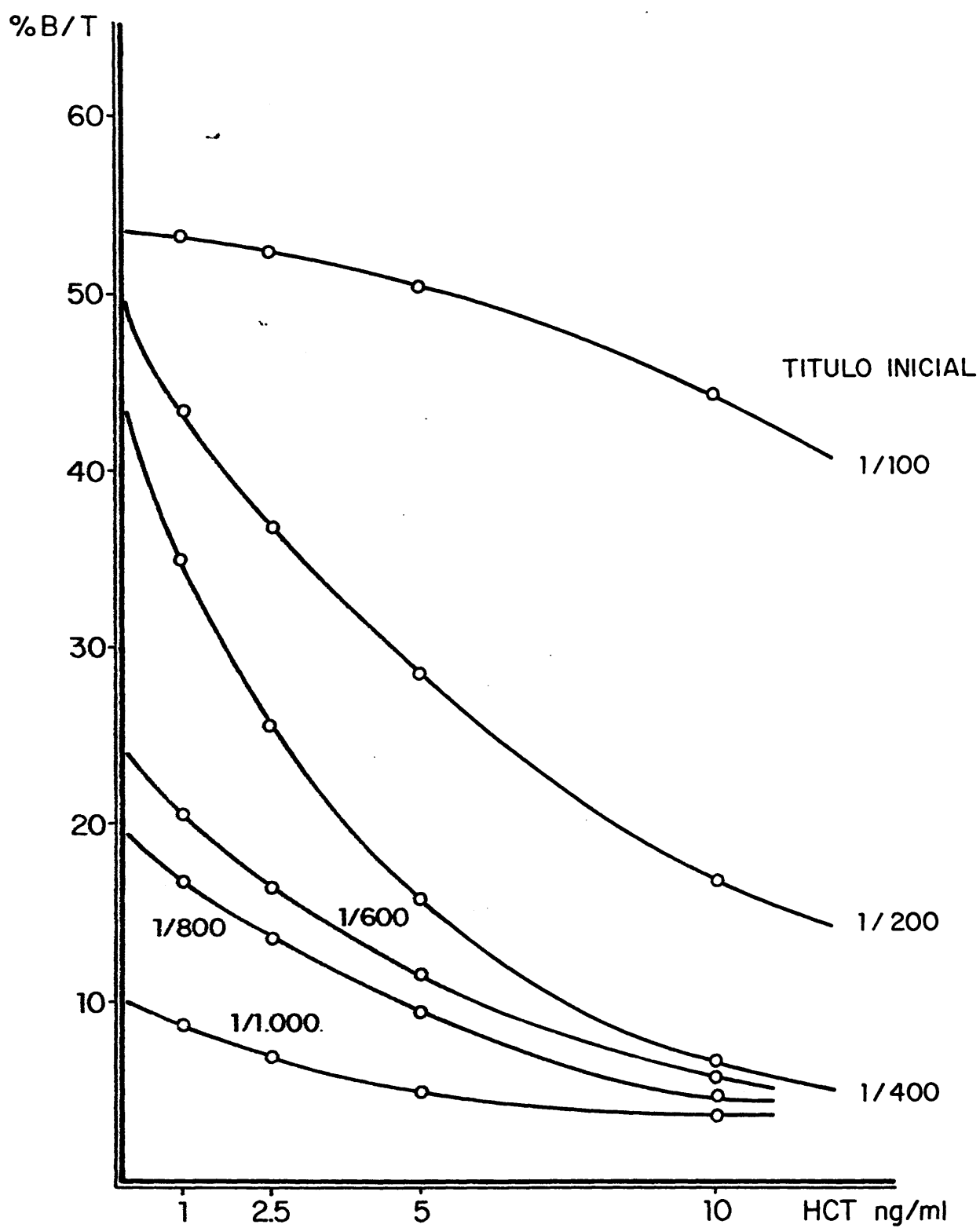


FIG. 13 - TITULACION DEL AB DEL EPSG (AB-II);
0.02 ng HCT = 9.000 cpm

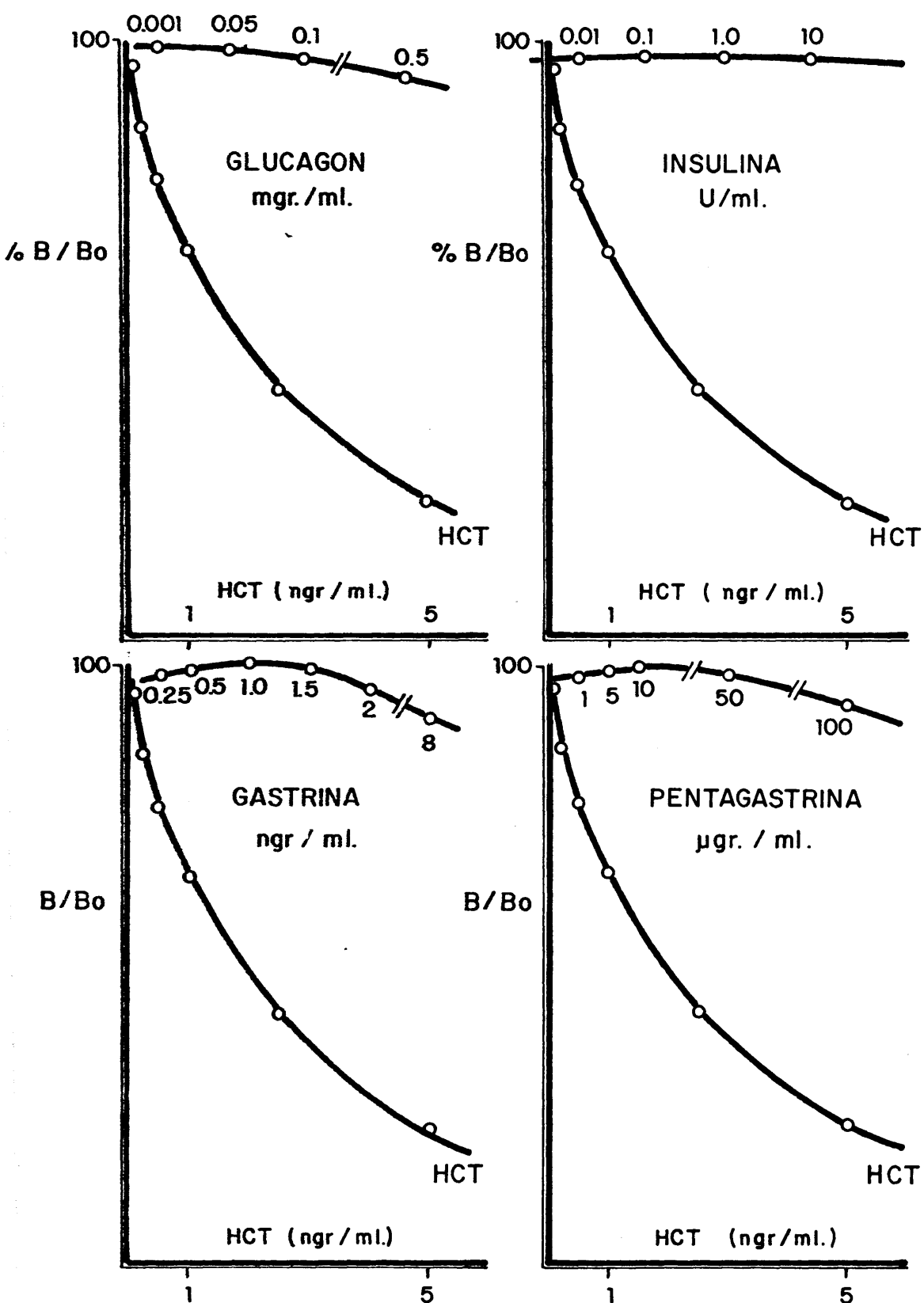


FIG. 14a- ESPECIFICIDAD (DEL AB-I ANTI - HCT). NO INTERFERENCIA CON GLUCAGON, INSULINA, GASTRINA Y PENTAGASTRINA.

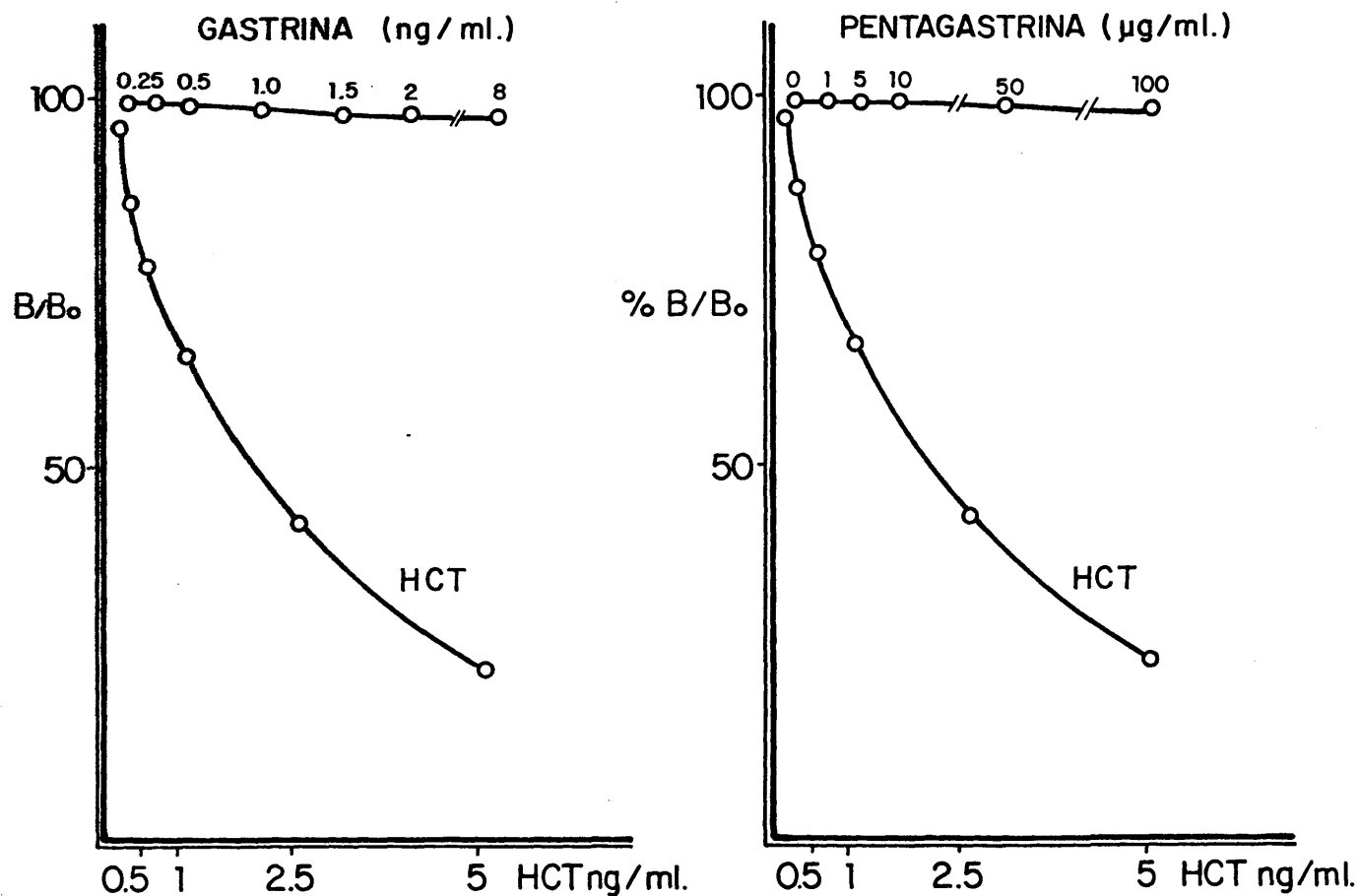
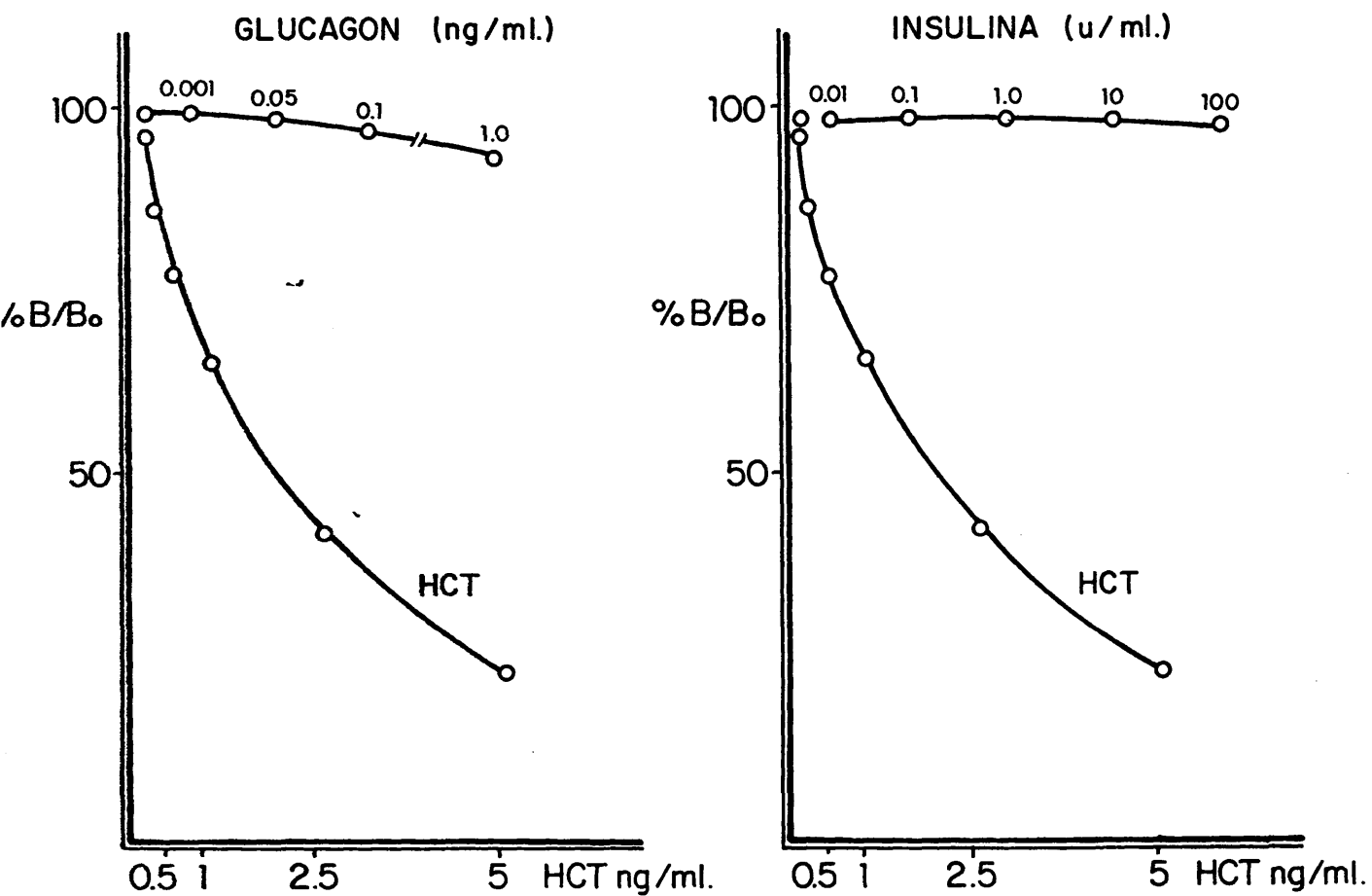


FIG. 14 b - ESPECIFICIDAD DEL AB DEL EPSG (AB - II)

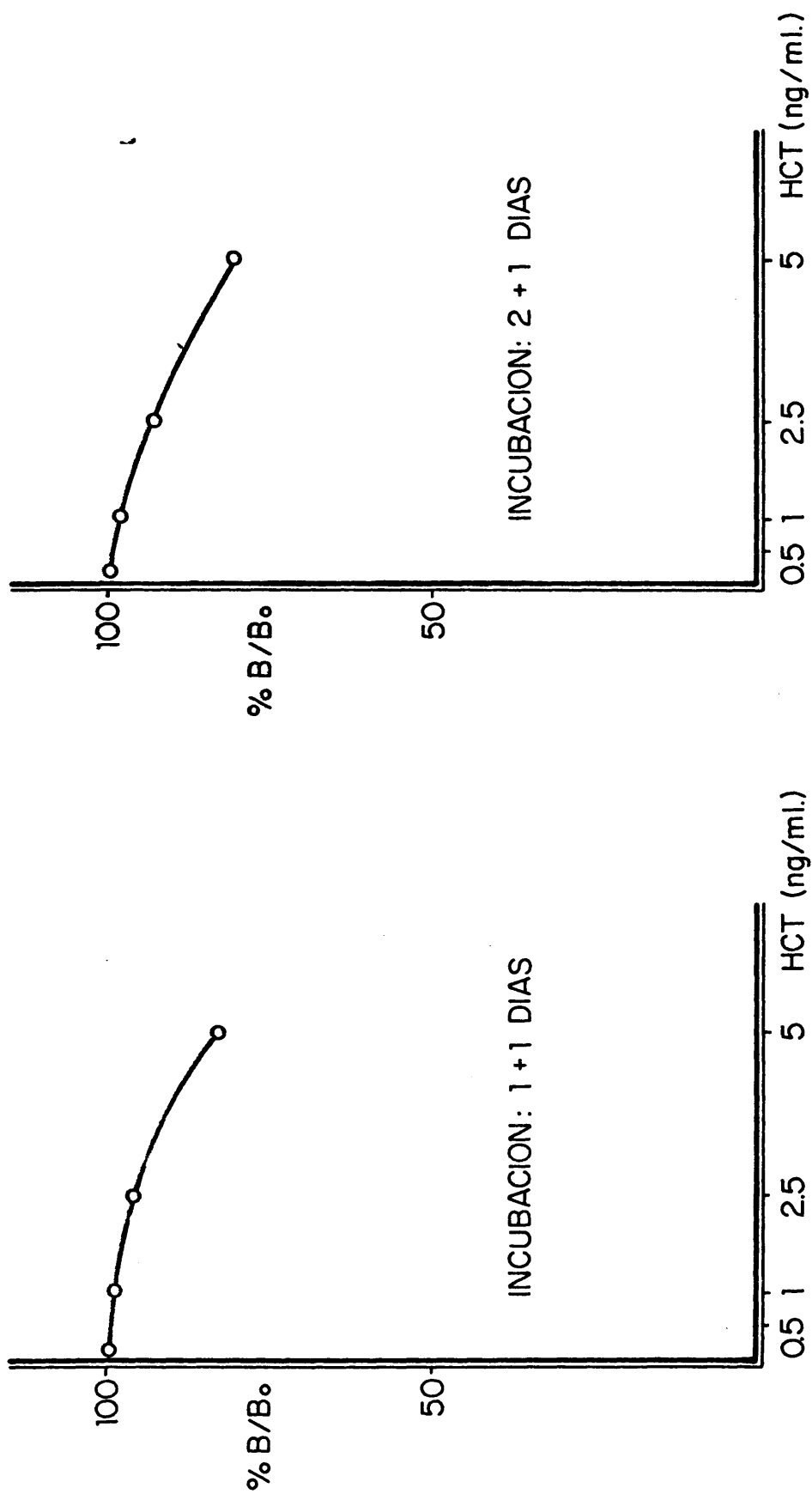


FIG. 15 a - CURVAS ESTANDARD PARA HCT. ESTUDIO DEL TIEMPO DE INCUBACION EN UN SISTEMA DE SATURACION SECUENCIAL.

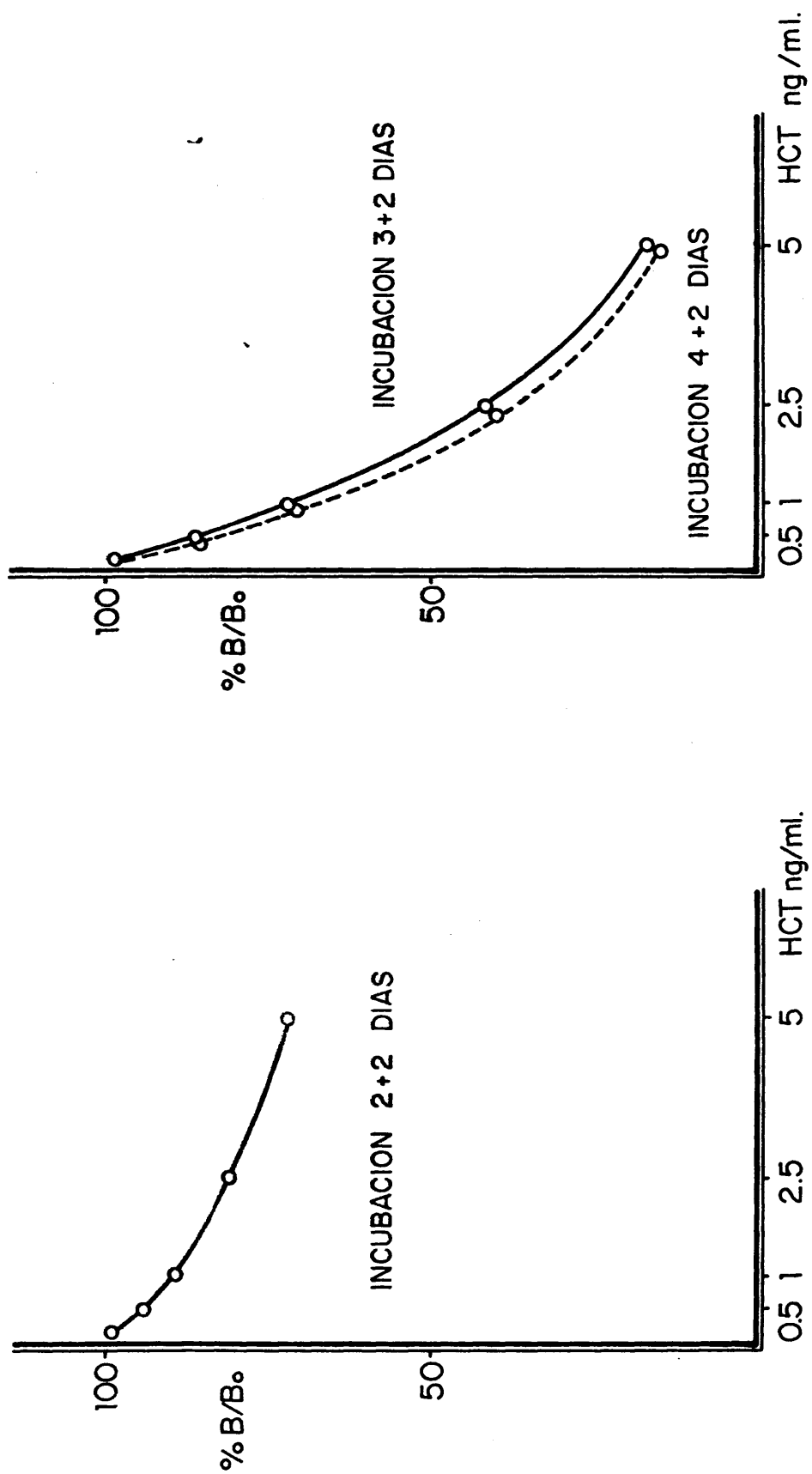


FIG. 15 b - CURVAS ESTANDARD PARA HCT. ESTUDIO DEL TIEMPO DE INCUBACION EN UN SISTEMA DE SATURACION SECUENCIAL. (Continuación)

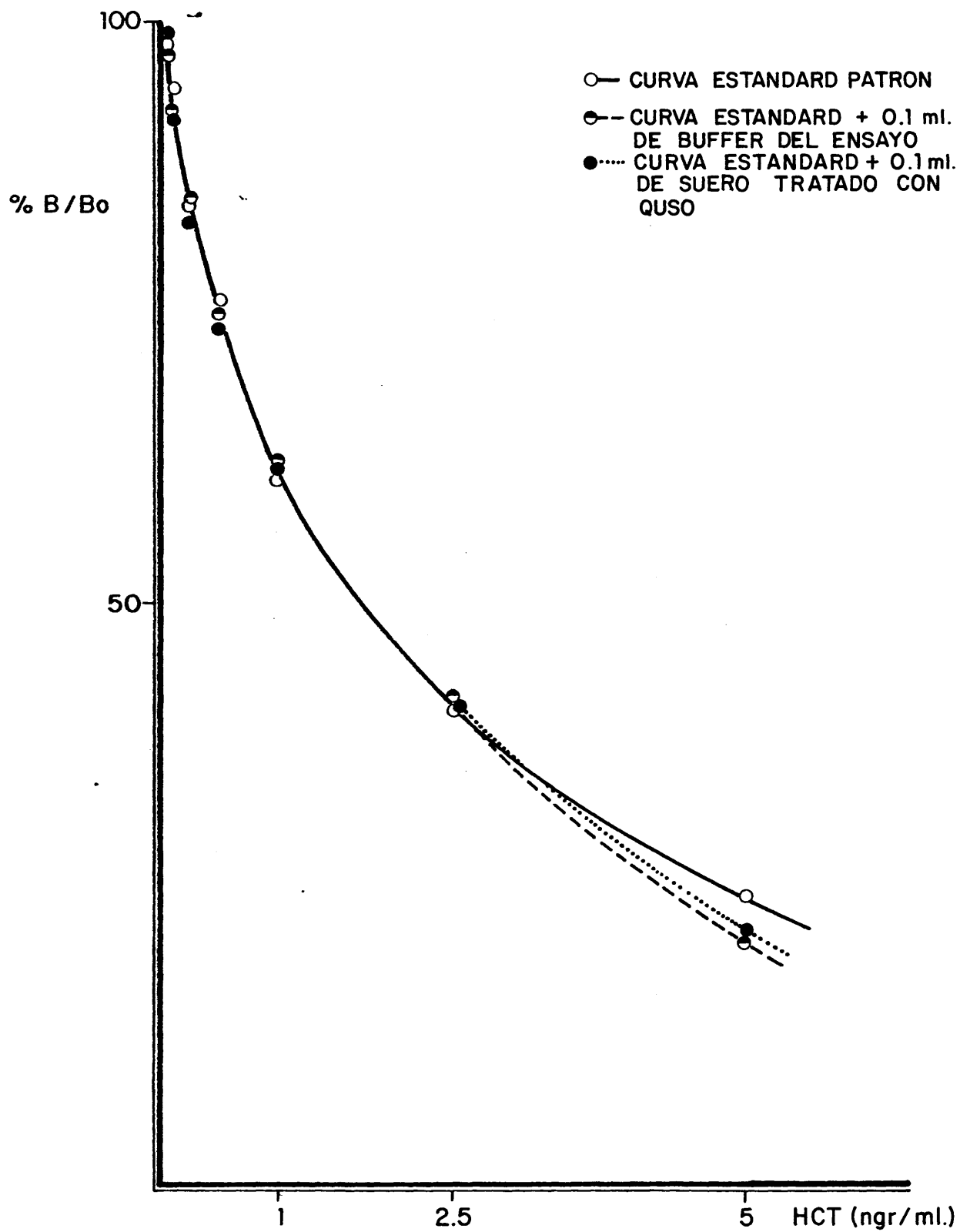
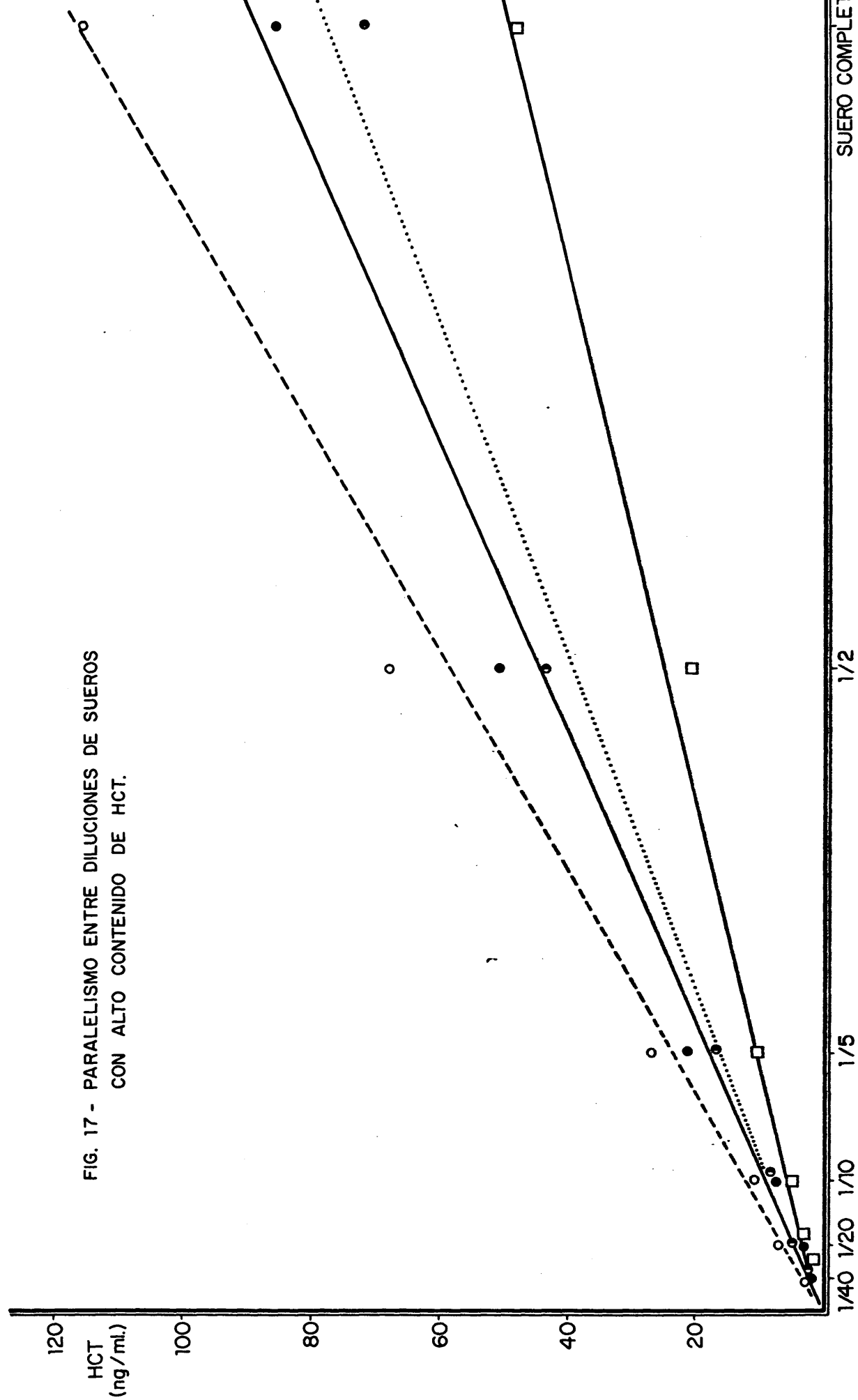


FIG. 16 - PARALELISMO BUFFER - SUERO SIN HCT.

FIG. 17 - PARALELISMO ENTRE DILUCIONES DE SUEROS
CON ALTO CONTENIDO DE HCT.



IV.3. CALIBRADO DE LA COLUMNA DE CROMATOGRAFIA.

Dado que el Pm de las diferentes formas circulantes de HCT puede deducirse a partir de su volumen de elución en su fraccionamiento a lo largo de una columna de Sephadex, es necesario calibrar previamente dicha columna con sustancias de Pm conocidos.

En la figura 18 se representa graficamente el perfil de elución de Azul Dextrano, Albúmina Humana marcada con I^{125} , STH- I^{125} , PTH- I^{125} , Insulina- I^{125} , HCT- I^{125} , y I^{125} en una columna de 1.5 x 60 cm de sephadex G-100.

En la figura 19.a se representa en un sistema cartesiano la relación entre el Kav de cada sustancia con su Pm, y en la fig. 19.b la relación entre el volumen de elución (Ve, en ordenadas) y el logaritmo decimal del Pm de cada sustancia (en abscisas).

Sustancia	Log Pm	Volumen de Elución		Kav $(V_e - V_o) / (V_t - V_o)^{**}$
		ml	%	
Azul Dext.	..6,301	31	30,4	0
Albúm. I^{125}	..4.845	43	42,1	0.18
STH- I^{125}	...4.447	58	56,8	0,39
PTH- I^{125}3,977	78	76,5	0,67
Insulina3,813	86	84,3	0,78
HCT- I^{125}3,544	94	92,1	0,88
I^{125}2,097	103	1,01	1,00

** Ve= volumen de elución de la sustancia.

V_o= volumen vacío de la columna.

V_t= volumen total de la columna.

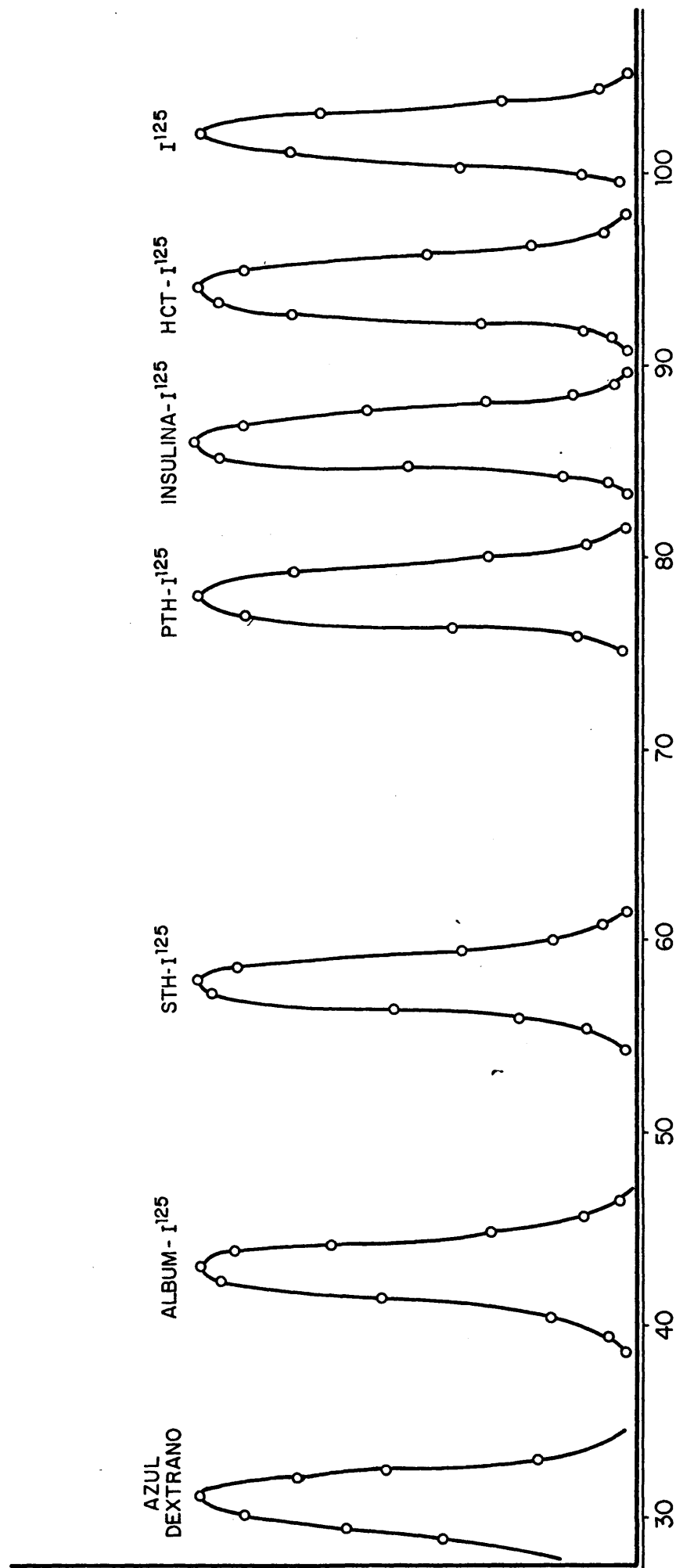
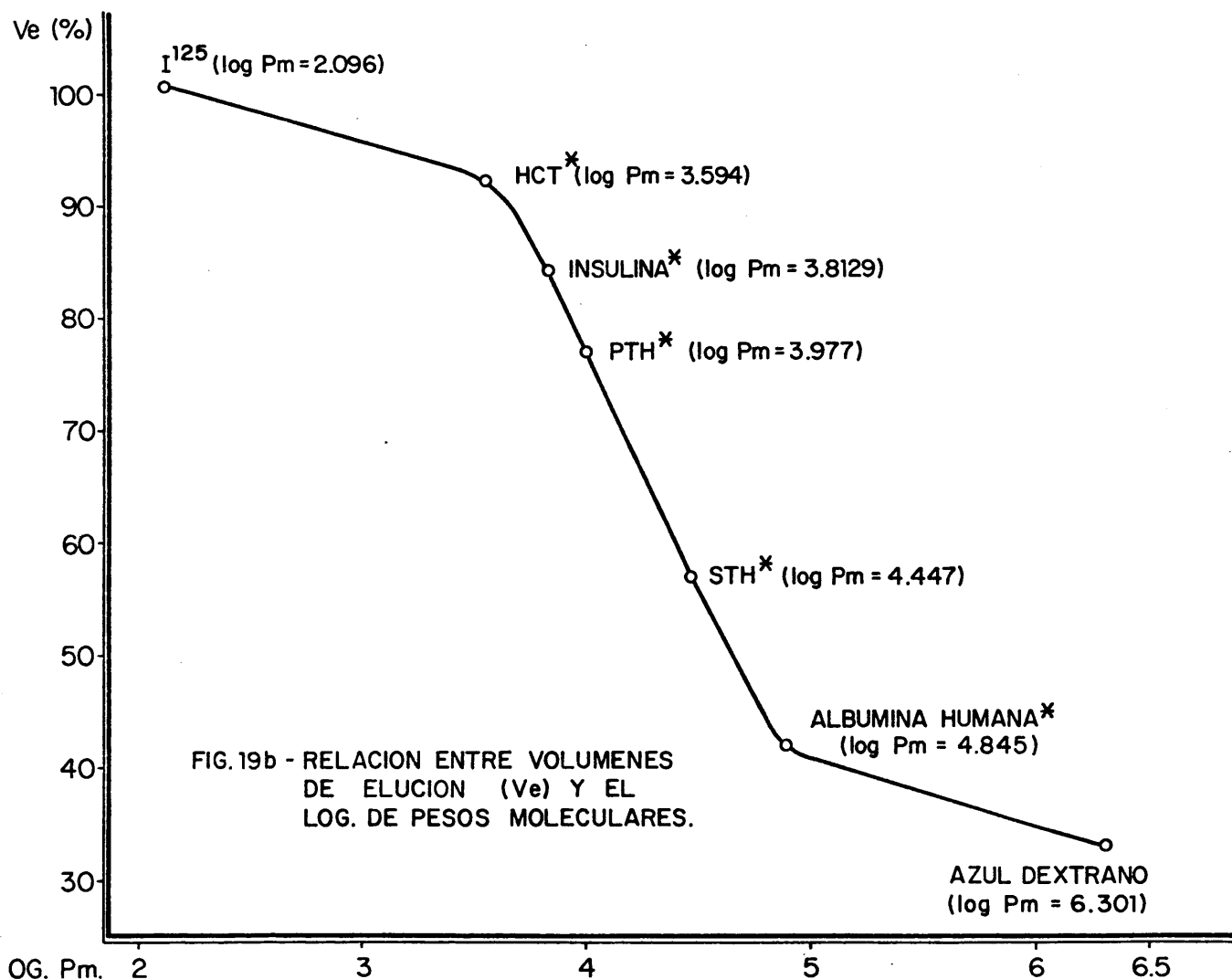
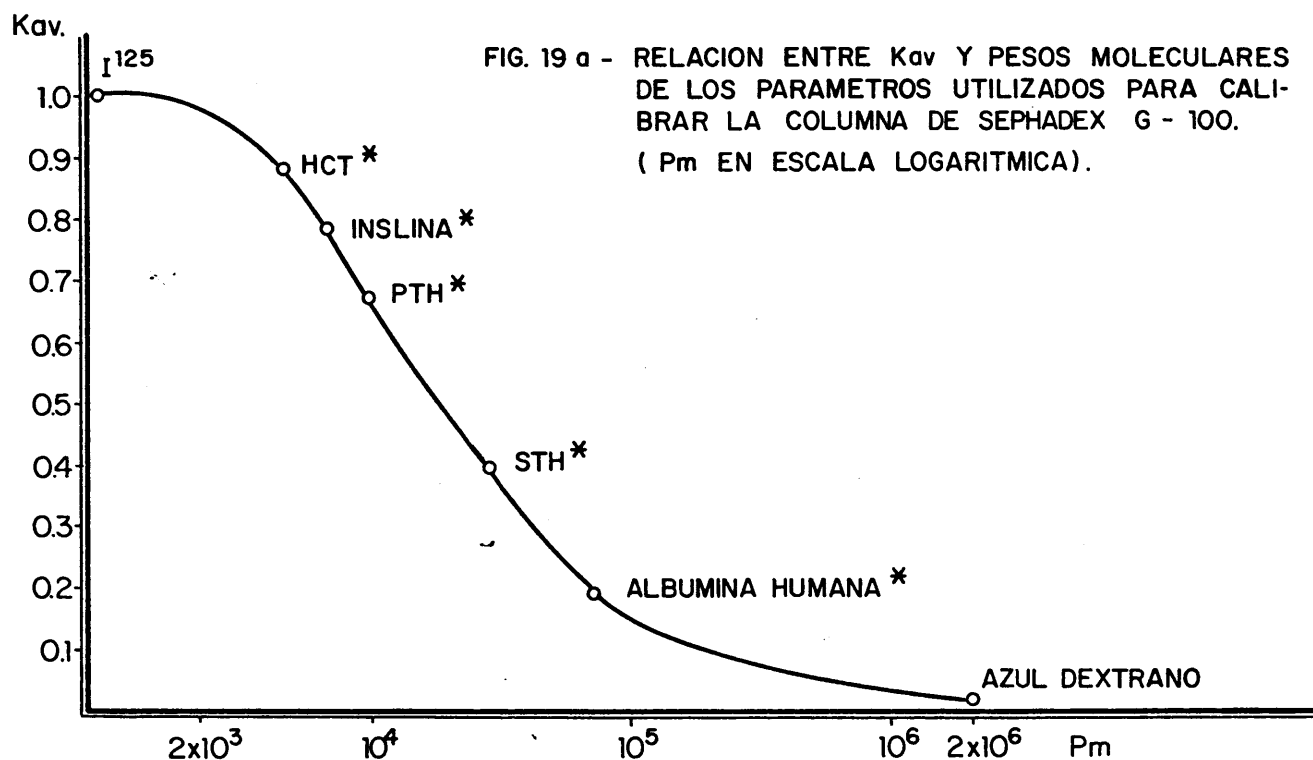


FIG. 18 - PERFIL DE ELUCION DE LAS DISTINTAS SUSTANCIAS UTILIZADAS COMO PARAMETROS PARA CALIBRAR UNA COLUMNA (1.5 x 60 cm.) DE SEPHADEX G-100. FRACCIONES DE 1 ml. VELOCIDAD DE FLUJO: 0.40 ml./minuto.



IV.4. NIVELES BASALES DE HCT EN DIFERENTES PROCESOS
NEOFORMATIVOS.

IV.4.1. NEOPLASIAS GASTRICAS.

N=38 (20,3% del total). \bar{X} edad=69,1 años (47-84).

	<u>HCT</u>	<u>Ca</u>	<u>P</u>		<u>HCT</u>	<u>Ca</u>	<u>P</u>
1	50	8,1mg%	3,3mg%	20	125	7,8mg%	3,9mg%
2	120	8,9	3,9	21	60	8,1	4,5
3	Tr	8,8	4,5	22	410	7,9	3,8
4	225	8,0	5,0	23	325	9,2	4,0
5	75	9,1	4,1	24	485	8,8	4,3
6	390	8,6	3,4	25	320	9,0	4,8
7	725*	9,2	4,5	26	110	8,0	3,5
8	60	8,0	3,4	27	80	7,9	3,8
9	255	8,4	4,2	28	250	8,8	4,7
10	305	8,8	4,7	29	350	7,7	4,6
11	270	7,9	3,9	30	Tr	8,1	4,0
12	110	9,3	4,9	31	125	9,0	5,1
13	75	8,5	4,4	32	Tr	9,4	3,7
14	Tr	9,0	4,8	33	220	8,1	4,4
15	Tr	8,8	3,2	34	260	7,9	4,6
16	410	8,1	3,9	35	125	8,5	3,9
17	385	8,9	4,4	36	405	9,2	5,2
18	205	8,0	3,9	37	315	9,6	3,8
19	290	9,1	4,8	38	360	8,0	4,3

Número de casos indetectables: 5 (13,15%).

\bar{X} HCT: 218 ± 166 pg/ml. r HCT/Ca= 0,101. r HCT/P= 0,234.

El caso n° 7 señalado con un asterisco (*) mostró en otros sueros obtenidos con diferencias de 15 y 25 días niveles respectivos de 305 y 440 pg/ml. La cifra de creatinina en sangre era de 0.9 mg% y el aclaramiento de creatinina de 94 ml/min.

IV.4.2. NEOPLASIAS DE BRONQUIO.

N=35. \bar{X} edad=65,0 años (55-79).

	HCT	Ca	P		HCT	Ca	P
	pg/ml	mg %	mg %		pg/ml	mg %	mg %
1	240	8,4	3,2	19	1900*	10,6	4,2
2	Tr	8,1	4,1	20	310	9,0	3,7
3	520	9,0	3,8	21	9400*	8,8	3,5
4	75	9,1	3,2	22	405	8,4	5,1
5	190	8,6	4,3	23	400	8,3	4,8
6	340	8,3	5,1	24	215	9,0	4,3
7	420	8,2	4,8	25	130	8,1	3,7
8	290	7,9	4,4	26	390	8,9	3,5
9	370	7,9	3,7	27	Tr	8,6	3,9
10	250	9,2	3,9	28	180	8,2	4,8
11	5325*	8,0	4,0	29	195	7,9	5,2
12	990*	7,9	3,9	30	205	8,1	3,9
13	210	8,2	4,4	31	200	7,8	3,6
14	420	8,6	5,0	32	130	9,0	4,7
15	290	8,5	4,7	33	190	8,2	4,3
16	Tr	9,0	4,5	34	6700*	8,0	3,9
17	310	8,9	4,6	35	310	8,1	5,0
18	405	8,2	5,1				

Número de casos con HCT basal indetectable: 3 (8,6%).

r HCT/Ca= 0,104. r HCT/P= -0,025. \bar{r} HCT/Ca:P= 0,238.

El caso n° 11 se trataba de un "oat cell" sin metástasis demostradas. El paciente tenía un aclaramiento de Creatinina de 86 ml/min con una Creatinina en sangre de 0,8 mg%. Se le practicó una prueba de estimulación con Pentagastrina cuyo resultado se recoge en la página siguiente.

El caso n° 12 correspondía a un carcinoma indiferenciado de células grandes sin metástasis en un paciente que poseía un aclaramiento de Creatinina de 110 ml/min con una creatinina en sangre de 0,9 mg%. La prueba de estimulación con Pentagastrina mostró los resultados descritos en la siguiente página.

Los casos 21 y 34 se trataban de dos carcinomas indiferenciados de células pequeñas en dos pacientes con aclaramientos de Creatinina de 81 y 77 ml/min respectivamente.

El caso n° 19 se trataba de un carcinoma epidermoide con metástasis en costillas y vértebras dorsales en un enfermo que tenía un aclaramiento de creatinina de 95 ml/min. No se consideró indicado realizar la prueba de estimulación con pentagastrina.

Resultados de la Prueba de Estimulación con Pentagastrina en los Casos de Carcinoma Bronquial con Niveles Basales de HCT significativamente Elevados.

CASO 11. (Oat cell sin metástasis. HCT basal: 5.2 ng/ml).
($p < 0.001$)

Estímulo: Pentagastrina, 0.5 ug/kg de peso, i.v.

	Basal	2'	5'	15'	30'	60'
HCT:	5.2	10.1	11.6	13.2	8.7	4.9

ng/ml.

CASO 12. (Ca. indiferenciado de c. grandes sin metástasis.
HCT basal: 950 pg/ml. $p < 0.01$).

	Basal	2'	5'	15'	30'	60'
HCT:	950	1510	1670	2890	1900	890

pg/ml.

CASO 21. (Oat cell sin metástasis. HCT basal: 9.9 ng/ml).
($p < 0.001$)

	Basal	2'	5'	15'	30'	60'
HCT:	9.9	10.6	14.9	23.6	15.5	9.8

ng/ml.

CASO 34. (Oat cell con metástasis in vértebra lumbar).
(HCT basal: 6.9 ng/ml. $p < 0.001$).

	Basal	2'	5'	15'	30'	60'
HCT:	6.9	7.2	9.6	16.5	11.1	7.8

ng/ml.

El incremento en los niveles basales de HCT obtenido con pentagastrina se halla comprendido entre

238 y 304%, (\bar{X} =259%), aumento que es estadísticamente significativo ($p < 0.001$). En la Fig. 20, de la página 161 se recogen de forma gráfica estos resultados, observándose como el máximo se alcanza en todos los casos hacia los 15' de iniciada la prueba, y los niveles de HCT a los 30' aún están por encima de los basales. En la tabla 6a (páginas 162 a 164) se muestran los valores numéricos al cromatografiar estos sueros en una columna de Sephadex G-100, y en la Fig. 21a,b,c el perfil cromatográfico.

En la tabla 6b (páginas 166 a 168) se recoge el resultado del fraccionamiento de los mismos sueros tratados con 2-Mercaptoetanol 3M y eluidos con un buffer fosfato-Urea 8M, resultado que gráficamente se muestra en la Fig. 22a, b y c.

En la tabla 6c (páginas 170 a 173) se describen los resultados numéricos al cromatografiar los sueros de pacientes con carcinoma bronquial después de efectuada la prueba de estimulación con pentagastrina, tratados con 2-Mercaptoetanol 3M y eluidos con un buffer fosfato-Urea 8M, (Fig. 23-1 y 23-2).

Los pacientes J.L.L.G (caso 11) y J.G.B (caso 34) fueron sometidos a una neumectomía completa del pulmón afectado. Los niveles basales medidos en sangre periférica 15 días después de la intervención fueron indetectables en ambos pacientes.

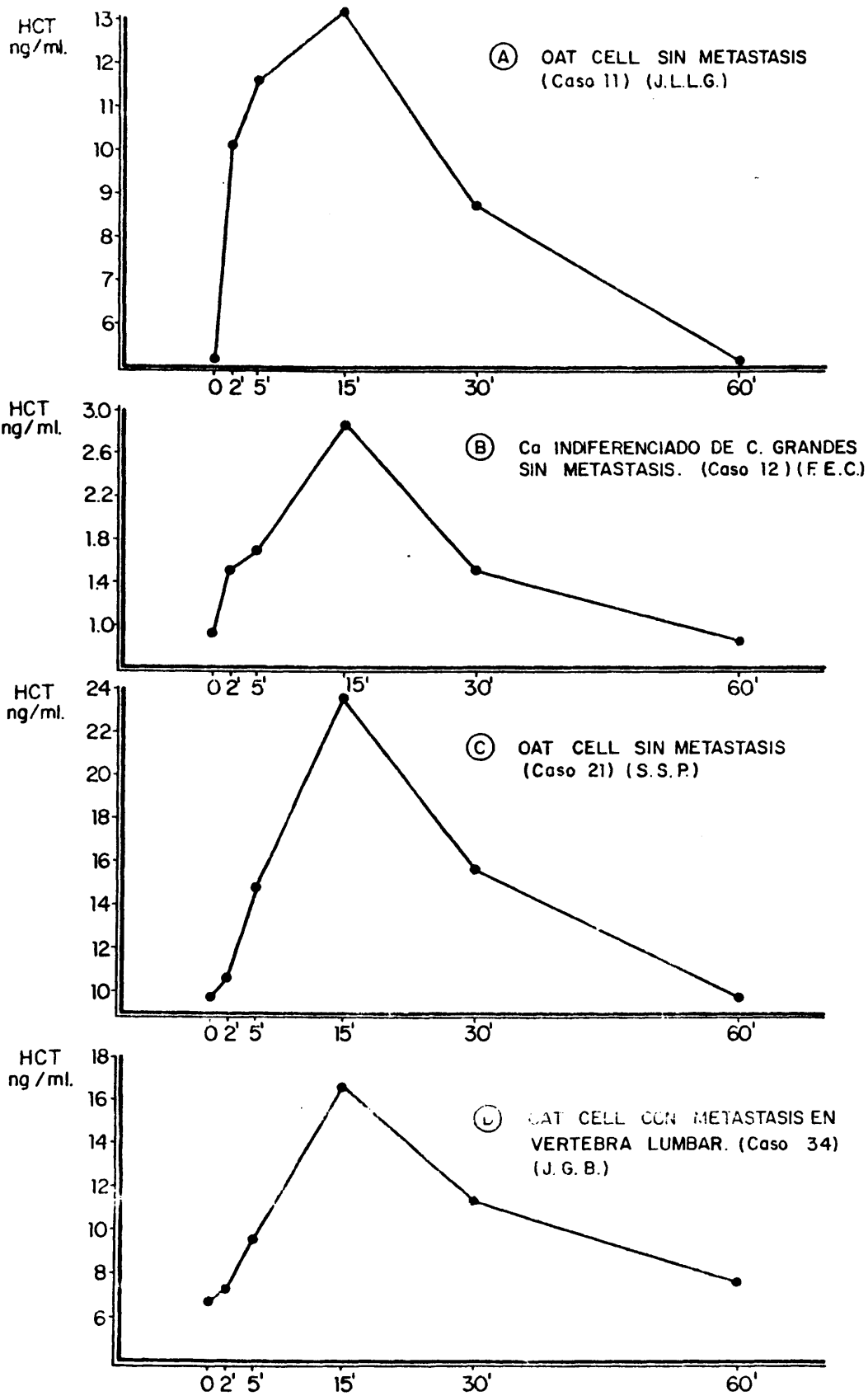


FIG. 20 - RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ESTIMULACION CON PENTAGASTRINA (0.5 $\mu\text{g/Kg}$) EN 4 CARCINOMAS BRONQUIALES.

DE SUEROS DE CARCINOMAS BRONQUIALES, BASALES. (Fracciones de 1ml)

CASO 11, (J.L.LG).

HCT basal: 5.2 ng (AB-I)
Se eluyeron 3 ml.

HCT basal: 4.2 ng/ml (AB-II)

Fracción	HCT	Fracción	HCT	Fracción	HCT	Fracción	HCT
n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
28	0.06	41	0.06	28	0.10	41	0.08
29	0.09	42	0.11	29	0.12	42	0.12
30	0.10	43	0.15	30	0.08	43	0.15
31	0.05	44	0.10	31	0.05	44	0.16
		45	0.04			45	0.13
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
67	0.10	80	0.10	70	0.12	79	0.10
68	0.20	81	0.15	71	0.18	80	0.14
69	0.39	82	0.25	72	0.24	81	0.34
70	0.61	83	0.40	73	0.21	82	0.46
71	0.62	84	0.82	74	0.17	83	0.54
72	0.69	85	0.89	75	0.10	84	0.62
73	0.70	86	0.87	Pico V		85	0.65
74	0.68	87	0.85	91	0.21	86	0.61
75	0.55	88	0.60	92	0.45	87	0.58
76	0.30	89	0.22	93	0.58	88	0.47
77	0.16	Pico V		94	0.69	89	0.26
78	0.15	91	0.15	95	0.73	90	0.19
		92	0.22	96	0.72		
		93	0.50	97	0.60		
		94	0.63	98	0.49		
		95	0.66	99	0.32		
		96	0.60	100	0.21		
		97	0.50				
		98	0.37				
		99	0.23				
		100	0.14				

Pico I: 0.30 ng (1.96%).
Pico II: 0.46 ng (3.0%).
Pico III: 5.4 ng (35.27%).
Pico IV: 5.15 ng (33.63%).
Pico V: 4.0 ng (26.12%).

HCT teóricamente eluida:
15.6 ng.

HCT recuperada (picos I-V):
15.31 ng (98.14%).

Pico I: 0.35 ng (2.92 ng).
Pico II: 0.64 ng (5.34%).
Pico III: 1.02 ng (8.52%).
Pico IV: 4.96 ng (41.43%).
Pico V: 5.00 ng (41.77%).

HCT teóricamente eluida:
12.6 ng.

HCT recuperada (picos I-V):
11.97 ng (95.0%).

TABLA 6a, (continuación). FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100
DE SUEROS DE CARCINOMAS BRONQUIALES, BASALES.

CASO 21, (S.S.P).

HCT basal: 9.9 ng/ml AB-I) ... HCT basal: 8.28 ng/ml (AB-II).
Se eluyeron 3 ml.

<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>
<u>n°</u>	<u>ng/ml</u>	<u>n°</u>	<u>ng/ml</u>	<u>n°</u>	<u>ng/ml</u>	<u>n°</u>	<u>ng/ml</u>
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
29	0.08	41	0.075	29	0.08	41	0.09
30	0.13	42	0.155	30	0.15	42	0.12
31	0.16	43	0.15	31	0.20	43	0.15
32	0.13	44	0.19	32	0.14	44	0.11
33	0.06	45	0.14			45	0.09
		46	0.095	Pico III		Pico IV	
Pico III		Pico IV		69	0.25	79	0.15
67	0.25	79	0.30	70	0.41	80	0.22
68	0.37	80	0.42	71	0.50	81	0.43
69	0.58	81	0.61	72	0.58	82	0.71
70	0.70	82	0.81	73	0.41	83	1.27
71	1.00	83	1.10	74	0.24	84	1.53
72	1.55	84	1.22	75	0.09	85	1.56
73	1.50	85	1.31			86	1.52
74	1.20	86	1.29	Pico V		87	1.45
75	0.81	87	1.10	91	0.30	88	1.08
76	0.54	88	0.80	92	0.50	89	0.40
77	0.33	89	0.45	93	0.72	90	0.24
78	0.23	90	0.29	94	1.25		
Pico V				95	1.41		
91	0.34 ng/ml			96	1.46		
92	0.50			97	1.29		
93	0.71			98	0.95		
94	0.96			99	0.55		
95	1.18			100	0.31		
96	1.22			101	0.19		
97	1.17						
98	0.72						
99	0.55						
100	0.34						
101	0.20						

Pico I: 0.56 ng (1.99%).
Pico II: 0.805 ng (2.85%).
Pico III: 9.09 ng (32.35%).
Pico IV: 9.7 ng (34.3%).
Pico V: 8.07 ng (28.61%).

HCT teóricamente eluida:
29.7 ng.

HCT recuperada (picos I-V):
28.22 ng (95.01%).

Pico I: 0.57 ng (2.44 %).
Pico II: 0.82 ng (3.51%).
Pico III: 2.48 ng (10.61%).
Pico IV: 10.56ng (45.2%).
Pico V: 8.93 ng (38.22%).

HCT teóricamente eluida:
24.84 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
23.36 ng (94.04%).

TABLA 6a., (Continuación). FRACCIONAMIENTOS EN SEPPADEX G-100
DE SUEROS DE CARCINOMAS BRONQUIALES, BASALES.

CASO 34, (J.G.B).

HCT basal: 6.9 ng/ml (AB-I)... HCT basal: 6.0 ng/ml (AB-II).
Se eluyeron 3 ml.

<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>
n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
30	0.10	42	0.085	30	0.09	41	0.09
31	0.14	43	0.12	31	0.13	42	0.13
32	0.12	44	0.14	32	0.16	43	0.18
33	0.085	45	0.05	33	0.19	44	0.10
Pico III		Pico IV		34	0.12	45	0.06
67	0.10	79	0.20	Pico III		Pico IV	
68	0.19	80	0.31	70	0.10	80	0.18
69	0.32	81	0.41	71	0.21	81	0.31
70	0.51	82	0.65	72	0.32	82	0.50
71	0.70	83	0.86	73	0.30	83	0.76
72	0.82	84	0.84	74	0.27	84	0.88
73	0.86	85	0.78	75	0.15	85	0.86
74	0.80	86	0.56			86	0.81
75	0.59	87	0.30			87	0.64
76	0.38	88	0.225			88	0.51
77	0.31	Pico V		Pico V			
78	0.17	89	0.24	89	0.53 ng/ml		
		90	0.32	90	0.59		
		91	0.40	91	0.71		
		92	0.52	92	0.90		
		93	0.83	93	1.05		
		94	1.21	94	1.16		
		95	1.25	95	1.20		
		96	1.15	96	1.17		
		97	0.81	97	0.85		
		98	0.41	98	0.48		
		99	0.25	99	0.145		
		100	0.16	100	0.100		

Pico I: 0.465 ng (2.4%).
Pico II: 0.395 ng (2.6 %).
Pico III: 5.575 ng (29.79%).
Pico IV: 5.135 ng (26.6 %).
Pico V: 7.555 ng (39.14%).
HCT teóricamente eluida:
20.7 ng.
HCT recuperada (picos I a V):
19.3 ng (93.24%).

Pico I: 0.69 ng (4.07%).
Pico II: 0.56 ng (3.3%).
Pico III: 1.35 ng (7.97%).
Pico IV: 5.45 ng (32.18%).
Pico V: 8.885 ng (52.46%).
HCT teóricamente eluida:
18.0 ng
HCT recuperada (picos I a V):
16.935 ng (94.09%).

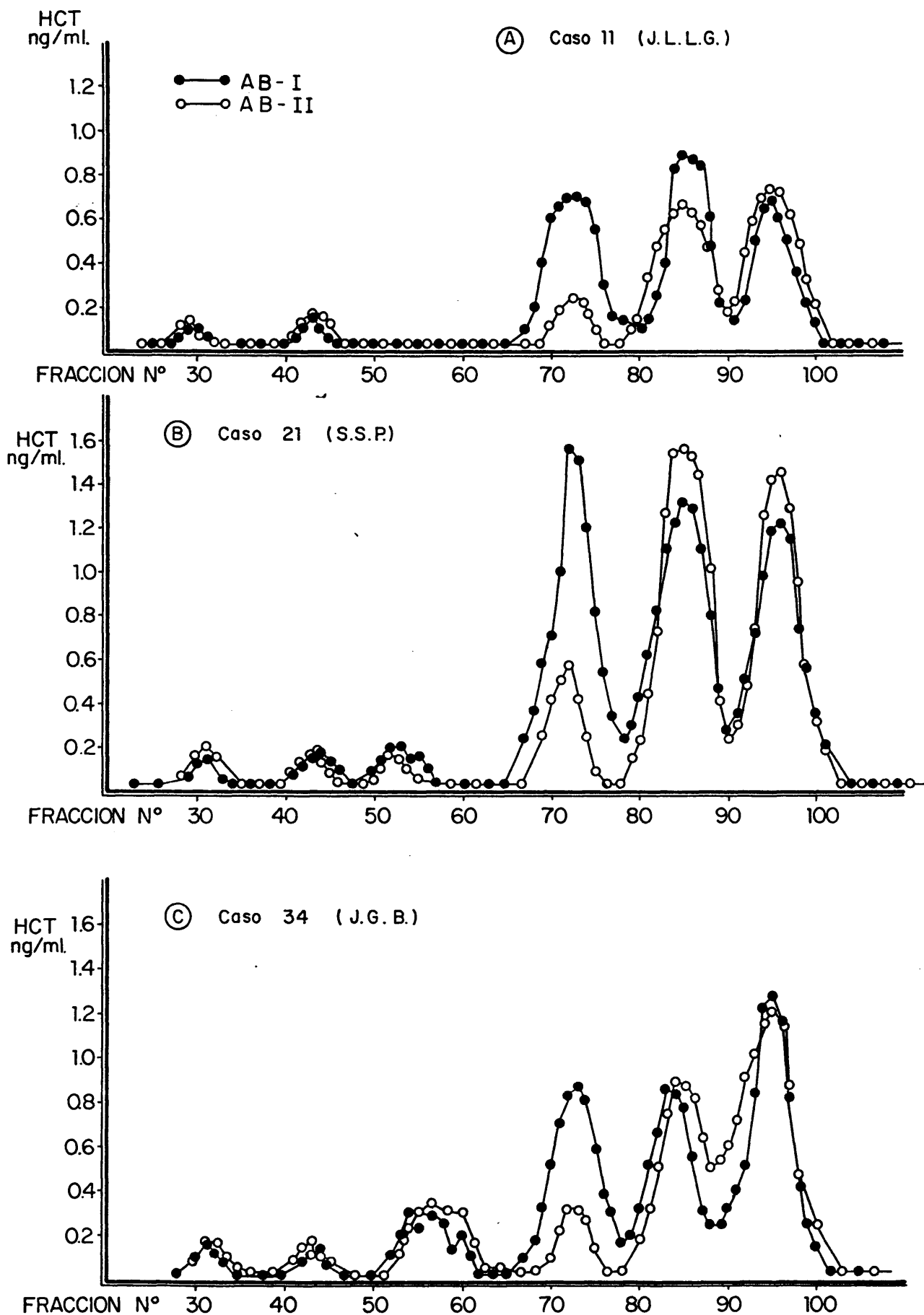


FIG. 21 - FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G.100 (COLUMNA 1.5 x 60 cm.)
DE SUEROS DE CARCINOMAS BRONQUIALES (BASALES)

TABLA 6b. FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100 (col.1,5x60 cm)
 DE SUEROS DE CARCINOMAS BRONQUIALES, BASALES, TRATADOS CON
 2-ME 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO-UREA 8M.
 (Fracciones de 1 ml).

CASO 11, (J.L.L.G).

HCT basal: 5.2 ng/ml (AB-I) ... HCT basal: 4.2 ng/ml (AB-II).
 Se eluyeron 2 ml de suero.

Fracción	HCT	Fracción	HCT	Fracción	HCT	Fracción	HCT
n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
28	0.065	41	0.095	27	0.06	41	0.10
29	0.115	42	0.180	28	0.10	42	0.15
Pico III		Pico IV		29	0.05	43	0.07
68	0.09	83	0.10	Pico III		Pico IV	
69	0.16	84	0.15	70	0.11	83	0.12
70	0.30	85	0.11	71	0.23	84	0.19
71	0.45	Pico V		72	0.16	85	0.14
72	0.64			73	0.12	86	0.07
73	0.62			Pico V			
74	0.60	89	0.12	89	0.17 ng/ml		
75	0.40	90	0.22	90	0.24		
76	0.31	91	0.33	91	0.43		
77	0.195	92	0.51	92	0.63		
		93	0.68	93	0.82		
		94	0.82	94	0.92		
		95	0.84	95	0.90		
		96	0.81	96	0.85		
		97	0.50	97	0.69		
		98	0.31	98	0.48		
		99	0.20	99	0.30		
		100	0.095	100	0.19		
Pico I: 0.18 ng (1.8%).				Pico I: 0.21 ng (2.57%).			
Pico II: 0.275 ng (2.75%).				Pico II: 0.32 ng (3.93%).			
Pico III: 3.765 (37.6%).				Pico III: 0.52 ng (6.37%).			
Pico IV: 0.36 ng (3.6%).				Pico IV: 0.485 ng (5.94%).			
Pico V: 5.435 ng (54.25%).				Pico V: 6.62 ng (81.15%).			
HCT teóricamente eluida:				HCT teóricamente eluida:			
10.4 ng.				8.4 ng.			
HCT recuperada (picos I a V):				HCT recuperada (picos I a V			
10.015 ng (96.3%).				8.155 ng (97.11%).			

TABLA 6b. FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100 DE SUEROS
DE CARCINOMAS BRONQUIALES, BASALES, TRATADOS CON 2-ME 3M
Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO-UREA 8M. (continuación).

CASO 21, (S.S.P).

HCT basal: 9.9 ng/ml (AB-I).. HCT basal: 8,28 ng/ml (AB-II).
Se eluyeron 2 ml de suero.

Fracción	HCT	Fracción	HCT	Fracción	HCT	Fracción	HCT
n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
30	0.05	41	0.09	30	0.08	41	0.09
31	0.13	42	0.15	31	0.11	42	0.17
32	0.10	43	0.19	32	0.09	43	0.11
		44	0.14				
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
67	0.09	84	0.11	70	0.10	84	0.095
68	0.10	85	0.25	71	0.25	85	0.18
69	0.31	86	0.18	72	0.34	86	0.15
70	0.59	Pico V		73	0.33	87	0.10
71	0.81	89	0.12	74	0.20		
72	1.01	90	0.29	75	0.09		
73	1.08	91	0.59	Pico V			
74	1.02	92	0.91	88	0.12ng/ml		
75	0.72	93	1.03	89	0.20		
76	0.51	94	1.30	90	0.51		
77	0.33	95	1.52	91	0.61		
78	0.15	96	1.45	92	0.98		
		97	1.30	93	1.40		
		98	0.82	94	1.59		
		99	0.42	95	1.63		
		100	0.26	96	1.55		
		101	0.20	97	1.41		
		102	0.11	98	1.00		
				99	0.73		
				100	0.51		
				101	0.24		
				102	0.13		

Pico I: 0.295 ng (1.6%).
Pico II: 0.57 ng (3.1 %)
Pico III: 6.72 ng (36.5%).
Pico IV: 0.495 ng (2.7%).
Pico V: 10.32 ng (56.1%).

HCT teóricamente eluida:
19.8 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
18,4 ng (92.9%).

Pico I: 0.28 ng (1.85%).
Pico II: 0.37 ng (2.45%).
Pico III: 1.31 ng (8.67%).
Pico IV: 0.525 ng (3.47%).
Pico V: 12.61 ng (83.5%).

HCT teóricamente eluida:
16.56 ng.

HCT recuperada (picos I a V)
15.1 ng (91.2%).

TABLA 6b, (continuación). FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100
DE SUEROS DE CARCINOMAS BRONQUIALES, BASALES, TRATADOS CON
2-ME 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO-UREA 8M.

CASO 34, (J.G.B).

HCT basal: 6.9 ng/ml (AB-I)... HCT basal: 6.0 ng/ml (AB-II).
 Se eluyeron 2 ml de suero.

Fracción	HCT	Fracción	HCT	Fracción	HCT	Fracción	HCT
n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
30	0.09	41	0.09	30	0.095	41	0.07
31	0.10	42	0.15	31	0.17	42	0.20
32	0.06	43	0.105	32	0.09	43	0.13
		44	0.06			44	0.05
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
68	0.15	84	0.075	70	0.11	84	0.11
69	0.23	85	0.12	71	0.26	85	0.25
70	0.38	86	0.10	72	0.13	86	0.17
71	0.68	87	0.05	73	0.07	87	0.10
72	0.78	Pico V		Pico V			
73	0.71	89	0.225	89	0.20	ng/ml	
74	0.56	90	0.450	90	0.44		
75	0.35	91	0.570	91	0.74		
76	0.27	92	0.690	92	1.08		
77	0.15	93	0.790	93	1.35		
		94	0.950	94	1.38		
		95	0.970	95	1.34		
		96	0.930	96	1.07		
		97	0.760	97	0.76		
		98	0.600	98	0.37		
		99	0.430	99	0.23		
		100	0.300	100	0.12		
		101	0.170				

Pico I: 0.25 ng (1.9%).
 Pico II: 0.405 ng (3.1%).
 Pico III: 4.26 ng (32.5%).
 Pico IV: 0.345 ng (2.65%).
 Pico V: 7.835 ng (59.8%).

HCT teóricamente eluida:
 13.8 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
 13.1 ng (94.92%).

Pico I: 0.255 ng (2.31%).
 Pico II: 0.455 ng (4.13%).
 Pico III: 0.57 ng (5.18%).
 Pico IV: 0.63 ng (5.72%).
 Pico V: 9.08 ng (82.54%).

HCT teóricamente eluida:
 12.0 ng.

HCT recuperada (picos I a V)
 11.0 ng (91.66%).

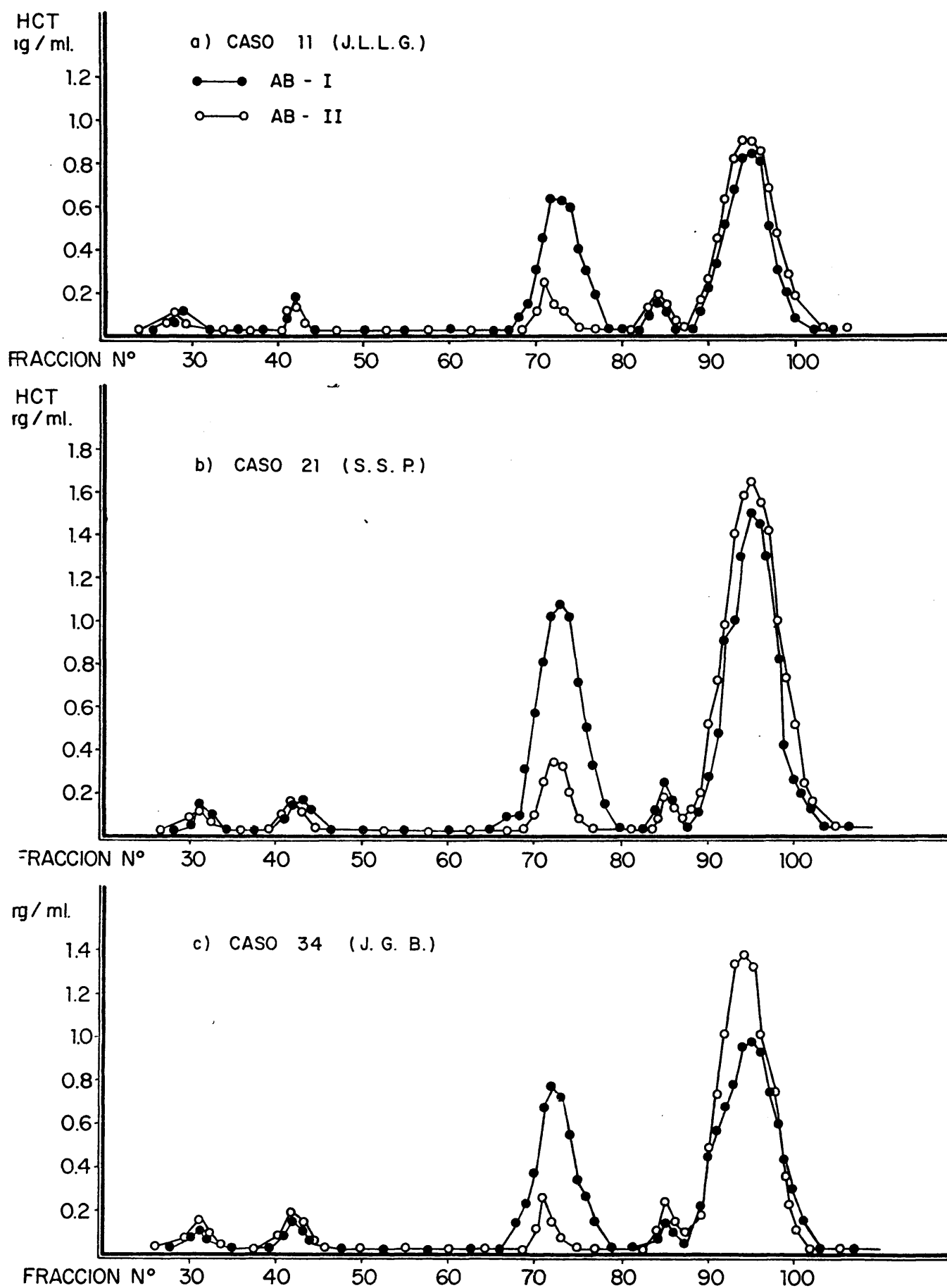


FIG. 22 - FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G. 100 DE SUEROS DE CARCINOMAS BRONQUIALES (BASALES), TRATADOS CON 2-ME 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO-UREA 8M.

TABLA 8C. FRACCIONAMIENTOS EN SELINADIA G-100 (COI:1,5X100 CM)
DE SUEROS DE CARCINOMAS BRONQUIALES TRAS ESTIMULACION CON
PENTAGASTRINA, TRATADOS CON 2-ME 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER
POSFATO-UREA 8M.(Fracciones de 1 ml).

CASO 11,(J.L.L.G).

HCT: 13.2 ng/ml (AB-I)....

HCT: 8.25 ng/ml (AB-II).

Se eluyeron 2 ml de suero.

<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
26	0.12	41	0.08	26	0.10	41	0.11
27	0.18	42	0.26	27	0.25	42	0.19
28	0.15	43	0.24	28	0.12	43	0.31
29	0.11	44	0.19	29	0.105	44	0.25
		45	0.09			45	0.13
pre-III		Pico III		pre-III		Pico III	
58	0.18	66	0.33	58	0.19	70	0.16
59	0.20	67	0.40	59	0.26	71	0.21
60	0.35	68	0.56	60	0.59	72	0.38
61	0.32	69	0.75	61	0.58	73	0.15
62	0.15	70	1.21	62	0.32	74	0.10
Pico V		71	1.58	63	0.21	Pico V	
87	0.19	72	1.73			88	0.09
88	0.28	73	1.70	Pico IV		89	0.21
89	0.41	74	1.27	81	0.06	90	0.39
90	0.66	75	0.86	82	0.16	91	0.78
91	0.90	76	0.60	83	0.17	92	1.21
92	1.20	77	0.40	84	0.13	93	1.40
93	1.23	78	0.34	85	0.07	94	1.44
94	1.24	79	0.22			95	1.33
95	1.15	Pico IV				96	1.10
96	0.80	82	0.13			97	0.89
97	0.51	83	0.21			98	0.58
98	0.36	84	0.24			99	0.46
99	0.30	85	0.14			100	0.23
100	0.13					101	0.14

Pico I: 0.56 ng (2.27%).
Pico II: 0.86 ng (3.48%).
Pre-III: 1.2 ng (4.86%).
Pico III: 11.95 ng (48.47%).
Pico IV: 0.72 ng (2.92%).
Pico V: 9.36 ng (37.97%).
HCT teóricamente eluida:

26.4 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
24.65 ng (93.37%).

Pico I: 0.575 ng (3.69%).
Pico II: 0.99 ng (6.36%).
Pre-III: 2.15 ng (13.82%).
Pico III: 1.0 ng (6.43%).
Pico IV: 0.59 ng (3.79%).
Pico V: 10.25 ng (65.89%).
HCT teóricamente eluida:

17.5 ng.

HCT recuperada (picos I a V)
15.555 ng (88.88%).

TABLA 6c, (continuación). FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100 DE SUEROS DE CARCINOMAS BRONQUIALES TRAS ESTIMULACION CON PENTAGASTRINA, TRATADOS CON 2-ME 3M Y FLUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO-UREA 8M.

CASO 12, (F.E.C).

HCT: 2.9 ng/ml (AB-I)...
Se eluyeron 3 ml de suero.

HCT: 2.2 ng/ml (AB-II).

Fracción	HCT	Fracción	HCT	Fracción	HCT	Fracción	HCT
n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
28	0.06	43	0.075	28	0.075	43	0.10
29	0.12	44	0.14	29	0.13	44	0.125
		45	0.10			45	0.095
pre-III		Pico III		pre-III		Pico III	
58	0.10	68	0.15	58	0.17	70	0.21
59	0.23	69	0.28	59	0.25	71	0.23
60	0.35	70	0.45	60	0.43	72	0.12
61	0.42	71	0.55	61	0.49	73	0.085
62	0.38	72	0.69	62	0.44		
63	0.25	73	0.66	63	0.23	Pico IV	
64	0.10	74	0.58			84	0.095
		75	0.35	Pico V		85	0.22
		76	0.12			86	0.11
Pico IV		Pico V		92	0.25		
84	0.13	92	0.12	93	0.47		
85	0.15	93	0.26	94	0.56		
86	0.09	94	0.41	95	0.52		
		95	0.33	96	0.46		
		96	0.27	97	0.32		
		97	0.165	98	0.19		
				99	0.10		

Pico I: 0.18 ng (2.22%).
Pico II: 0.315 ng (3.9%).
Pre-III: 1.83 ng (44.64%).
Pico III: 3.83 ng (47.4%).
Pico IV: 0.37 ng (4.57%).
Pico V: 1.555 ng (19.24%).

HCT teóricamente eluida:
8.7 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
8,08 ng (92.87%).

Pico I: 0.205 ng (3.16%).
Pico II: 0.32 ng (4.94%).
Pre-III: 2.01 ng (31.04%).
Pico III: 0.645 ng (9.96%).
Pico IV: 0.425 ng (6.56%).
Pico V: 2.87 ng (43.24%).

HCT teóricamente eluida:
6.6 ng.

HCT recuperada (picos I a V)
6.475 ng (98.10%).

CASO 21, (S.S.P).

HCT: 23.6 ng/ml (AB-I).
Se eluyeron 2 ml de suero.

HCT: 13.1 ng/ml (AB-II).

Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
28	0.09	43	0.195	28	0.12	43	0.17
29	0.21	44	0.290	29	0.16	44	0.23
30	0.185	45	0.410	30	0.19	45	0.32
31	0.05	46	0.300	31	0.11	46	0.30
		47	0.120	pre-III		47	0.15
Pre-III		Pico III		58	0.26	48	0.105
57	0.12	67	0.55	59	0.47	Pico III	
58	0.20	68	1.10	60	0.61	71	0.23
59	0.33	69	1.45	61	0.79	72	0.55
60	0.51	70	2.11	62	0.92	73	0.44
61	0.65	71	2.40	63	0.89	74	0.19
62	0.73	72	2.65	64	0.56	Pico V	
63	0.72	73	2.63	65	0.40	88	0.32
64	0.64	74	2.49	66	0.13	89	0.50
65	0.41	75	1.96			90	0.83
66	0.29	76	1.51	Pico IV		91	1.15
Pico V		77	1.20	82	0.25	92	1.69
88	0.29	78	0.80	83	0.43	93	2.10
89	0.40	79	0.62	84	0.46	94	2.28
90	0.79	80	0.50	85	0.40	95	2.20
91	1.16	81	0.40	86	0.13	96	1.79
92	1.52	Pico IV				97	1.28
93	1.99	82	0.43			98	0.81
94	2.05	83	0.48			99	0.47
95	1.96	84	0.35			100	0.21
96	1.61	85	0.26			101	0.13
97	1.22	86	0.11				
98	0.72						
99	0.33						
100	0.19						

Pico I: 0.535 ng (1.2%).
Pico II: 1.315 ng (2.94%).
Pre-III: 4.6 ng (10.3%).
Pico III: 22.37 ng (50.06%).
Pico IV: 1.63 ng (3.64%).
Pico V: 14.23 ng (31.84%).

HCT teóricamente eluida:
47.2 ng

HCT recuperada (picos I a V):
44.68 ng (94.66%).

Pico I: 0.58 ng (2.25%).
Pico II: 1.275 ng (4.95%).
Pre-III: 5.03 ng (19.55%).
Pico III: 1.41 ng (5.48 %).
Pico IV: 1.67 ng (6.49%).
Pico V: 15.76 ng (61.26%).

HCT teóricamente eluida:
26.2 ng.

HCT recuperada (picos I a V)
25.72 ng (98.17%).

CASO 34, (J.G.B).

HCT: 16.5 ng/ml (AB-I).

HCT: 10.5 ng/ml (AB-II).

Se eluyeron 3 ml de suero.

Fracción n°	HCT ng/ml	Fracción n°	HCT ng/ml	Fracción n°	HCT ng/ml	Fracción n°	HCT ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
29	0.125	42	0.175	30	0.22	42	0.125
30	0.210	43	0.480	31	0.33	43	0.43
31	0.380	44	0.360	32	0.25	44	0.55
32	0.150	45	0.120	33	0.20	45	0.83
pre-III		Pico III		pre-III		46	0.23
59	0.19	65	0.55	59	0.22	Pico III	
60	0.41	66	0.83	60	0.41	70	0.25
61	0.86	67	1.25	61	0.83	71	0.59
62	0.83	68	1.61	62	0.89	72	0.68
63	0.54	69	2.19	63	0.75	73	0.52
64	0.42	70	2.68	64	0.42	74	0.28
Pico V		71	2.92	65	0.30	75	0.15
89	0.32	72	3.05	Pico IV		Pico V	
90	0.61	73	2.97	83	0.21	89	0.37
91	1.00	74	2.62	84	0.45	90	1.10
92	1.43	75	2.20	85	0.43	91	2.20
93	1.80	76	1.39	86	0.36	92	2.39
94	1.85	77	0.76	87	0.20	93	2.42
95	1.64	78	0.40	88	0.10	94	2.37
96	1.47	79	0.22			95	1.85
97	1.09	Pico IV				96	1.11
98	0.60	83	0.31			97	0.94
99	0.33	84	0.67			98	0.56
100	0.21	85	0.99			99	0.44
101	0.09	86	0.87			100	0.35
		87	0.75			101	0.19
		88	0.38			102	

Pico I: 0.865 ng (1.82%).

Pico II: 1.235 ng (2.6%).

Pre-III: 3.25 ng (6.85%).

Pico III: 25.64 ng (54.09%).

Pico IV: 3.97 ng (8.37%).

Pico V: 12.44 ng (26.24%).

HCT teóricamente eluida:

49.5 ng.

HCT recuperada (picos I a V):

47.4 ng (95.75%).

Pico I: 1.0 ng (3.44%).

Pico II: 2.165 ng (7.46%).

Pre-III: 3.82 ng (13.16%).

Pico III: 2.47 ng (8.51%).

Pico IV: 1.75 ng (6.03%).

Pico V: 17.82 ng (61.39%).

HCT teóricamente eluida:

31.5 ng.

HCT recuperada (picos I a V)

29.025 ng (92.14%).

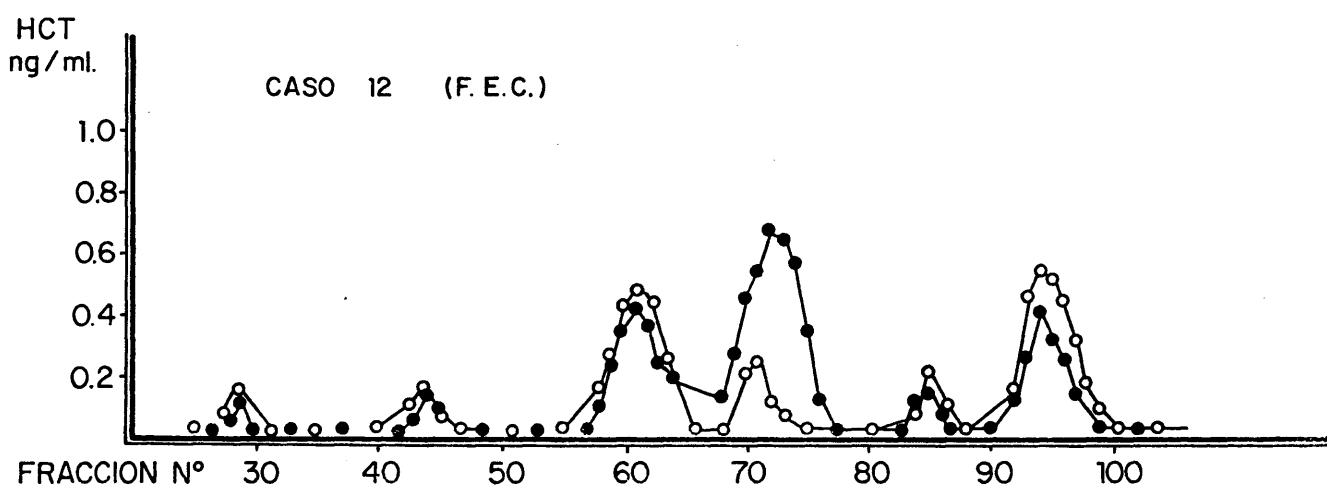
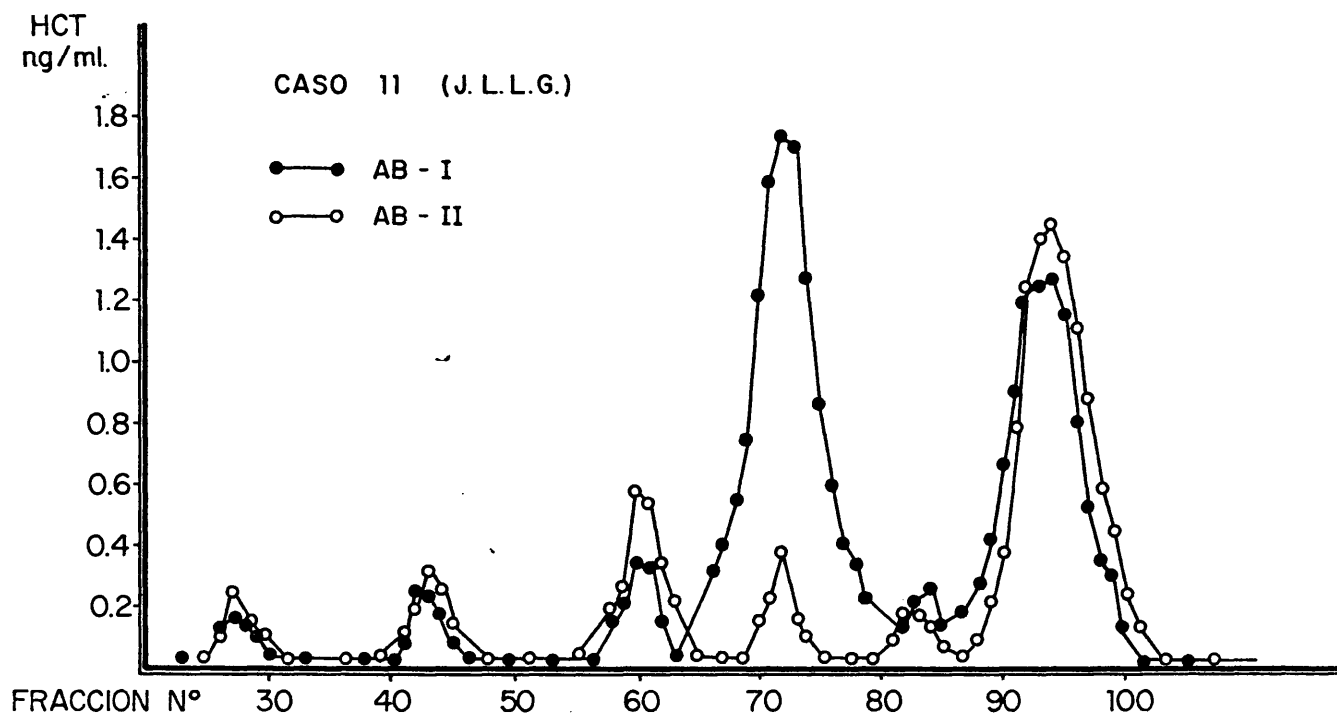


FIG. 23-1.- FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G.100 DE SUEROS DE CARCINOMAS BRONQUIALES TRAS ESTIMULACION CON PENTAGASTRINA TRATADOS CON 2-ME 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO - UREA 8 M.

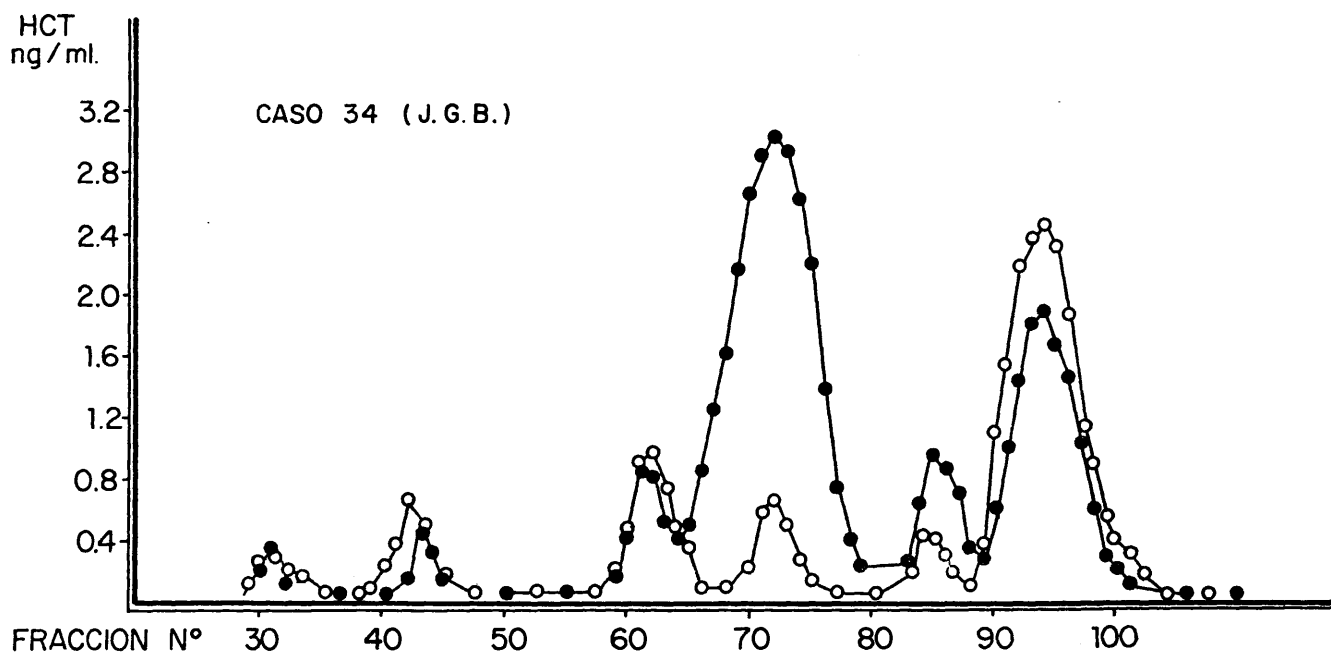
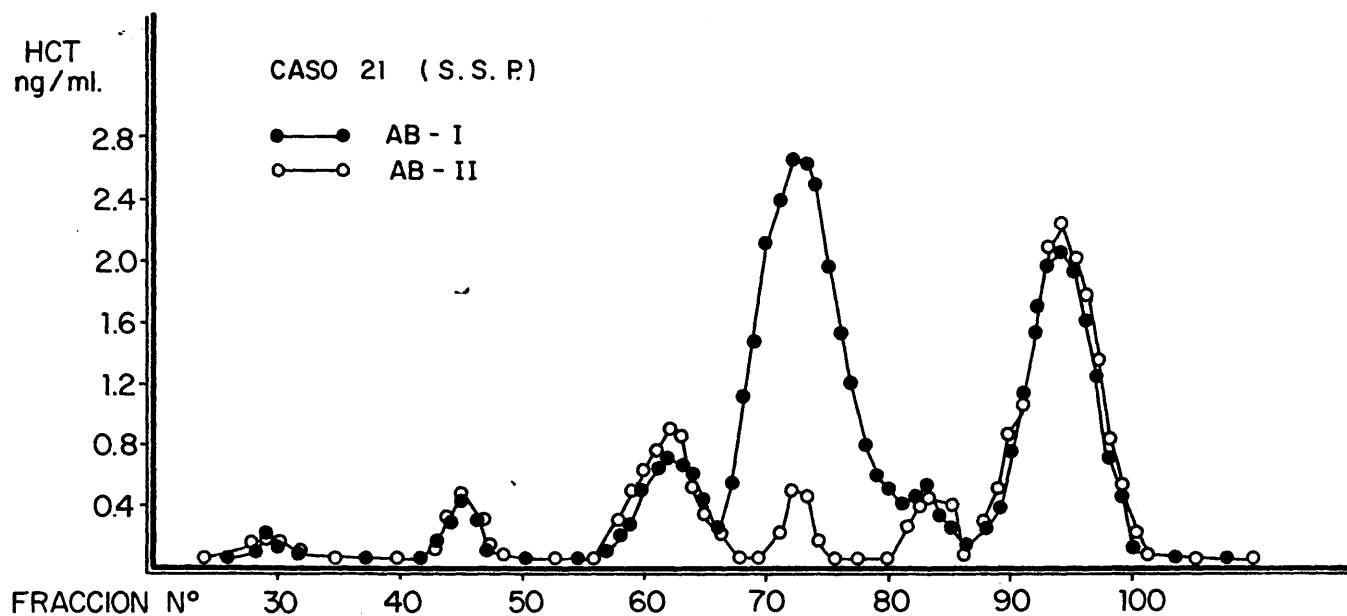


FIG. 23 - 2.- FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G.100 DE SUEROS DE CARCINOMAS BRONQUIALES TRAS ESTIMULACION CON PENTAGASTRINA, TRATADOS CON 2-ME 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO - UREA 8 M.

Puede observarse en la representación gráfica de los fraccionamientos en Sephadex como es constante la aparición de cinco "picos" inmunoreactivos, ello tanto al eluir el suero obtenido en condiciones basales como después de la prueba de estimulación con pentagastrina. Tales picos eluyen respectivamente en: 1°/ volumen vacío de la columna (pico I; $P_m \geq 150.000$), 2°/ volumen de elución de la albúmina (pico II; P_m aprox. 70.000), 3°/ volumen de elución comprendido entre hormona de crecimiento (STH) y Parathormona (PTH), (pico III; P_m aprox. 14.000), 4°/ volumen ligeramente previo al de la elución de la Insulina (pico IV; P_m aprox. 7.000), y 5°/ volumen de elución del monómero de HCT (pico V; P_m 3.500).

No se han hallado picos inmunoreactivos de P_m inferior al del monómero de HCT.

Además de esas cinco fracciones se aprecian algunas otras de aparición inconstante e irregular que no se recogen cuando los sueros son eluidos con buffer fosfato-Urea 8M. El pico IV deja de observarse cuando los sueros son tratados con 2-Mercaptoetanol lo que apoya firmemente la suposición de que se trata de un agregado (probablemente un dímero de la HCT) en cuya formación intervienen puentes disulfuro, observándose como al reducirse esta fracción IV se incrementa significativamente la fracción V indicando la transformación de aquella en el monómero de HCT.

Al realizar la estimulación con pentagastrina se observan dos fenómenos al cromatografiar los sueros de pacientes con carcinomas bronquiales con niveles basales de HCT significativamente elevados: 1°/ aparece una nueva fracción inmunoreactiva (que llamamos pre-III por eluir delante de la fracción III) a la que le corresponde un P_m aproximado de 22.000, y que no desaparece al tratar el suero con 2-ME y eluirlo con b. fosfato-Urea 8M; 2°/ por otra parte la fracción III aumenta significativamente con esta prueba de estimulación, no modificándose apenas la fracción V.

IV.4.3. NEOPLASIAS TIROIDEAS.

N=14. \bar{X} edad= 53.3 años.

a). CARCINOMAS TIROIDEOS NO MEDULARES.

	<u>HCT</u>	<u>Ca</u>	<u>P</u>
1)	260 pg/ml	7.9 mg%	3.2 mg%
2)	Tr.	8.2 "	4.5 "
3)	390 "	8.1 "	4.2 "
4)	290 "	8.4 "	3.7 "
5)	165 "	10.4 "	3.6 "
6)	910 "	10.8 "	3.9 "
7)	290 "	8.9 "	4.0 "

Correlación : $r_{HCT:Ca}=0.565$; $r_{HCT:P}= - 0.107$

$r_{HCT:Ca/P}= 0.604$ (no significativo).

CASO n°2 (C.A.E). Los niveles basales de HCT eran indetectables. Corresponía a un adenocarcinoma folicular sin metástasis óseas.

CASO n°6 (F.R.D): HCT significativamente elevada ($p < 0.05$). Se trataba de un ca. anaplásico con metástasis en fémur izquierdo, una vértebra lumbar, ilíaco y pulmones. No se hizo prueba de estimulación con pentagastrina por no aconsejarlo el estado del paciente y la coexistencia de una causa de hipercalcitoninemia como son las metástasis óseas.

RESULTADO DE LA PRUEBA DE ESTIMULACION CON PENTAGASTRINA EN CARCINOMAS TIROIDEOS NO MEDULARES.

	<u>BASAL</u>	<u>2'</u>	<u>5'</u>	<u>15'</u>	<u>30'</u>	<u>60'</u>
HCT (pg/ml):	230	525	410	330	160	190
	Tr.	Tr.	Tr.	110	105	Tr.
	430	950	620	390	450	415
	225	720	700	415	290	310

IV.4.3. NEOPLASIAS TIROIDEAS.(continuación).

b). CARCINOMAS MEDULARES.

	<u>HCT</u>	<u>Ca</u>	<u>P</u>
1)	280 ng/ml	9.8 mg%	4.0 mg%
2)	320 "	8.8 "	4.1 "
3)	73 "	9.1 "	3.9 "
4)	31 "	7.9 "	5.0 "
5)	6 "	9.1 "	4.9 "
6)	110 "	8.2 "	4.7 "
7)	23 "	8.9 "	4.3 "

Correlación: r HCT:Ca= 0.390

r HCT:P = - 0.592 (no significativo).

r HCT:Ca/P= 0.559 (no significativo).

PACIENTES 11 y 12 ,(P.A.G y M.E.A.G):

Eran hermanos y el segundo fué diagnosticado por la determinación de HCT sérica al demostrarse que P.A.G poseía un carcinoma medular tiroideo (CMT).

PACIENTE 13 (C.S.N):

Diez años atrás se le había practicado una tiroidectomía total por un CMT. Se le hizo una prueba de estimulación con pentagastrina después de una determinación basal de HCT por la aparición de adeno-

patías cervicales que histológicamente mostraban signos de metástasis de un carcinoma medular tiroideo (CMT).

A continuación, (Tabla 7), se recogen los resultados de la prueba de infusión prolongada de calcio (15 mg/kg de peso) en cinco de estos pacientes, indicando simultaneamente los valores hallados según el anticuerpo (AB) utilizado.

TABLA 7 . RESULTADO DE LA PRUEBA DE INFUSION PROLONGADA DE CALCIO EN PACIENTES CON CARCINOMA MEDULAR TIROIDEO.

CASO 8.(L.B.M)

		Basal	15'	30'	60'	120'	180'	240'
HCT	AB-I ..	290	265	276	385	619	465	350
ng/ml	AB-II .	150	142	145	205	325	310	260

Incremento: 213% (AB-I); 216% (AB-II).

CASO 9.(M.A.J.N).

		Basal	15'	30'	60'	120'	180'	240'
HCT	AB-I ..	260	245	250	285	725	540	350
ng/ml	AB-II .	176	180	175	205	467	350	225

Incremento: 279% (AB-I); 265% (AB-II).

CASO 10.(S.C.P)

		Basal	15'	30'	60'	120'	180'	240'
HCT	AB-I ..	82	80	79	425	405	360	145
ng/ml	AB-II .	53	50	62	275	255	235	95

Incremento: 518% (AB-I); 519% (AB-II).

CASO 11.(P.A.G)

		Basal	15'	30'	60'	120'	180'	240'
HCT	AB-I ..	26	25	30	110	120	115	70
ng/ml	AB-II .	20	20	19	81	86	80	55

Incremento: 461% (AB-I); 430 % (AB-II).

CASO 12.(M.E.A.G).

		Basal	15'	30'	60'	120'	180'	240'
HCT	AB-I ..	5.5	5.3	6.1	14.6	12.2	8.1	6.9
ng/ml	AB-II .	4.3	4.4	5.16	11.2	9.25	6.5	5.5

Incremento: 265 % (AB-I); 260% (AB-II).

El incremento en los niveles basales de HCT obtenido con esta prueba osciló entre 213 y 518 % ($\bar{X}=347\%$) con el AB-I, y entre 216% y 519 % ($\bar{X}=338$) con el AB-II. Tal incremento es estadísticamente significativo ($p<0.0$

La prueba de inyección i.v rápida de pentagastrina ofreció en estos pacientes los resultados recogidos en la Tabla 8.

TABLA 8. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ESTIMULACION CON PENTAGASTRINA (0.5 µg/kg de peso) EN CMT.

CASO 8.(L.B.M)

		Basal	2'	5'	15'	30'	60'
HCT	AB-I ..	280	1850	1590	610	330	260 ng/ml
ng/ml	AB-II .	144	925	802	320	165	135

Incremento: 568% (AB-I); 557% (AB-II).

CASO 9.(M.A.J.N)

		Basal	2'	5'	15'	30'	60'
HCT	AB-I ..	290	1080	1150	305	270	260 ng/ml
ng/ml	AB-II .	185	460	471	200	175	170

Incremento: 396% (AB-I); 254% (AB-II).

CASO 10.(S.CP)

		Basal	2'	5'	15'	30'	60'
HCT	AB-I ..	73	810	880	210	105	80 ng/ml
ng/ml	AB-II .	49.5	415	451	130	70	55

Incremento: 1205 % (AB-I); 911 % (AB-II).

CASO 11.(P.A.G).

		Basal	2'	5'	15'	30'	60'
HCT	AB-I ..	30	280	320	59	29	33 ng/ml
ng/ml	AB-II .	22	145	153	45	20	25

Incremento: 1066 % (AB-I); 695 % (AB-II).

CASO 12.(M.E.A.G)

		Basal	2'	5'	15'	30'	60'
HCT	AB-I ..	5.7	66	62	37	6.5	6.2 ng/ml
ng/ml	AB-II .	4.3	42.6	40	28	5.1	4.8

Incremento: 1158 % (AB-I); 990 % (AB-II).

CASO 13.(C.S.N)

		Basal	2'	5'	15'	30'	60'
HCT	AB-I ..	110	680	1045	430	95	95 ng/ml
ng/ml	AB-II .	76	460	500	295	66	66

Incremento: 950 % (AB-I); 658 % (AB-II).

CASO 14.(P.G.R)

		Basal	2'	5'	15'	30'	60'
HCT	AB-I ..	25	165	175	32	28	29 ng/ml
ng/ml	AB-II .	19.5	95	103	25	22	22

Incremento: 700 % (AB-I); 658% (AB-II).

\bar{X} Incremento : 863 % (396 - 1205%) .. AB-I. ($p < 0.001$).
656 % (254 - 990%) .. AB-II. ($p < 0.001$).

Los resultados de las tablas 7 y 8 se recogen de forma grafica en las fig. 24,25 y 26. Puede observarse como la máxima respuesta a la infusión de calcio se obtiene hacia los 60-120' de iniciada la prueba, y que a los 240' los niveles de HCT aún se mantienen por encima de los basales.

Con la inyección i.v rápida de penta-gastrina el máximo incremento en las cifras basales de HCT se alcanza entre los 2 y los 5 minutos después de iniciada la prueba, y al finalizarla a los 60' los niveles de HCT son similares a los basales.

El incremento obtenido con esta segunda prueba de estimulación (\bar{X} = 863% con el AB-I, y 656% con el AB-II) es significativamente superior al conseguido con la infusión prolongada de calcio, ($p < 0.001$).

HETEROGENEIDAD.

La heterogeneidad de la HCT circulante en estos pacientes de CMT se estudió cromatografiando alícuotas de sus sueros en una columna (1.5 x 60 cm) de Sephadex G-100. Como se indica más atrás se emplearon dos tipos diferentes de antisuero: uno el AB comercializado por Calbiochem A.G y que es con el que trabajamos habitualmente, y otro AB obtenido en cabra por el EPSG (European PTH Study Group).

En primer lugar se eluyeron los sueros basales, obteniéndose los resultados numéricos de la tabla 9a (pag. 185-191), representados en las figuras 27-1,-2,-3. Para eliminar las posibles fracciones debidas a la formación de puentes hidrógeno se utilizó como eluyente un buffer fosfato-urea 8M, y para eliminar agregados secundarios al establecimiento de puentes disulfuro, los sueros fueron incubados con 2-Mercaptoetanol 3M (2-ME 3M) durante 1h a temperatura ambiente, (Tabla 9b; fig.28-1,-2,-3). Los resultados del fraccionamiento tras la estimulación con calcio se muestran en la tabla 9c (fig.29-1,29-2) y con pentagastrina en la tabla 9d (fig.30-1,-2,-3).

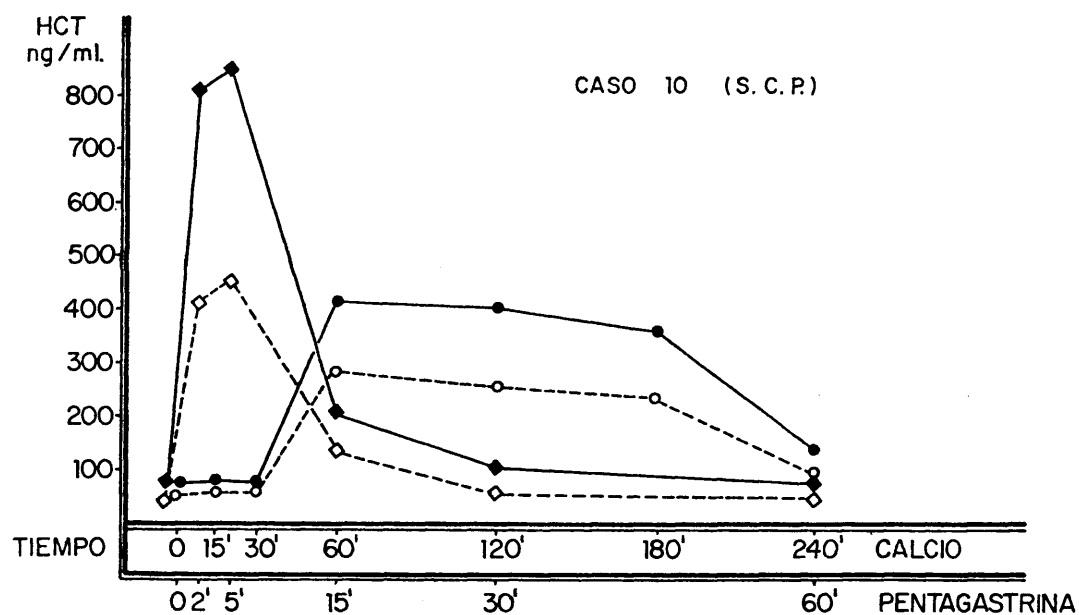
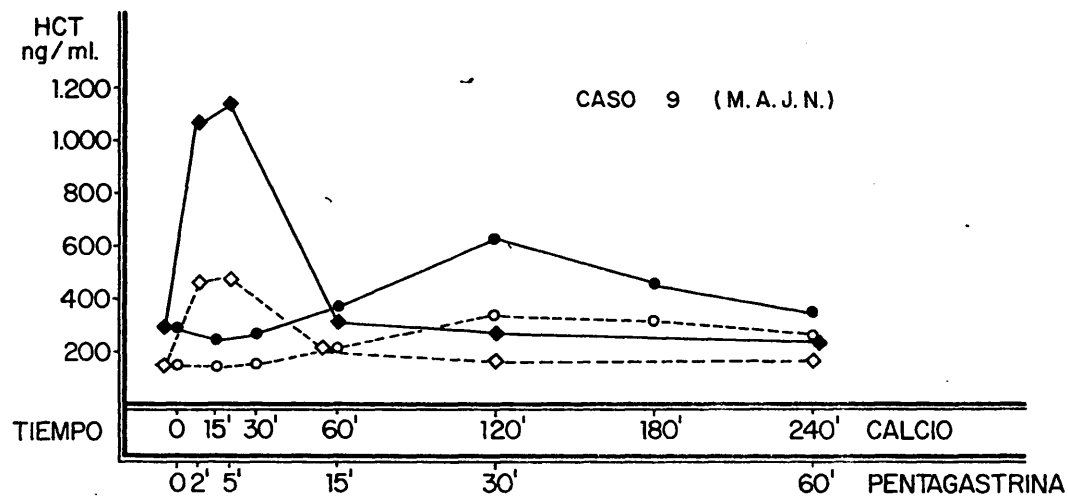
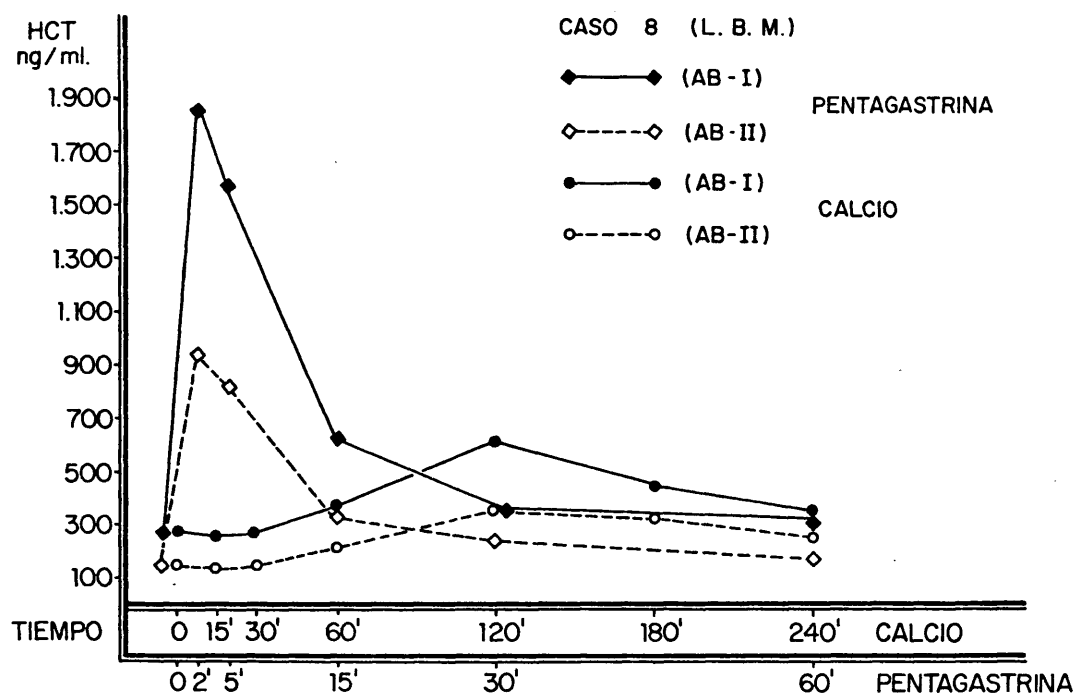


FIG. 24.- RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ESTIMULACION CON CALCIO Y PENTAGASTRINA EN CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS.

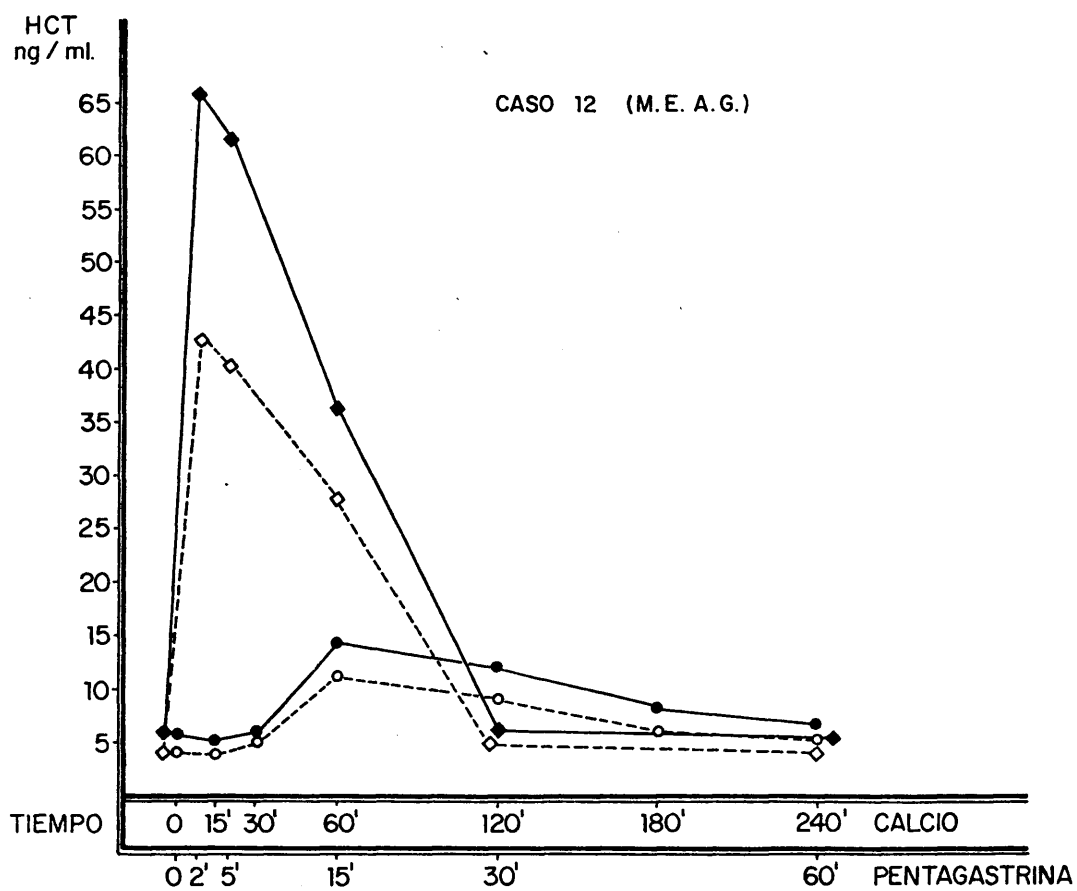
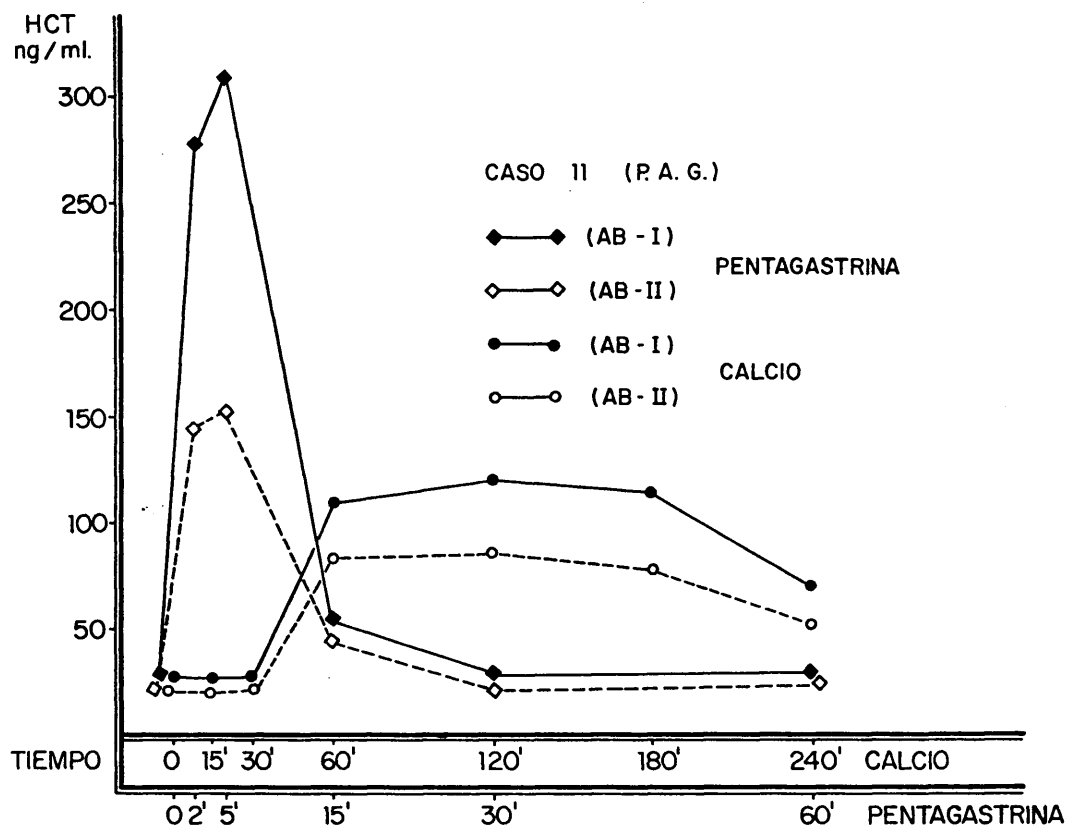


FIG. 25 - RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ESTIMULACION CON CALCIO Y PENTAGASTRINA EN CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS.

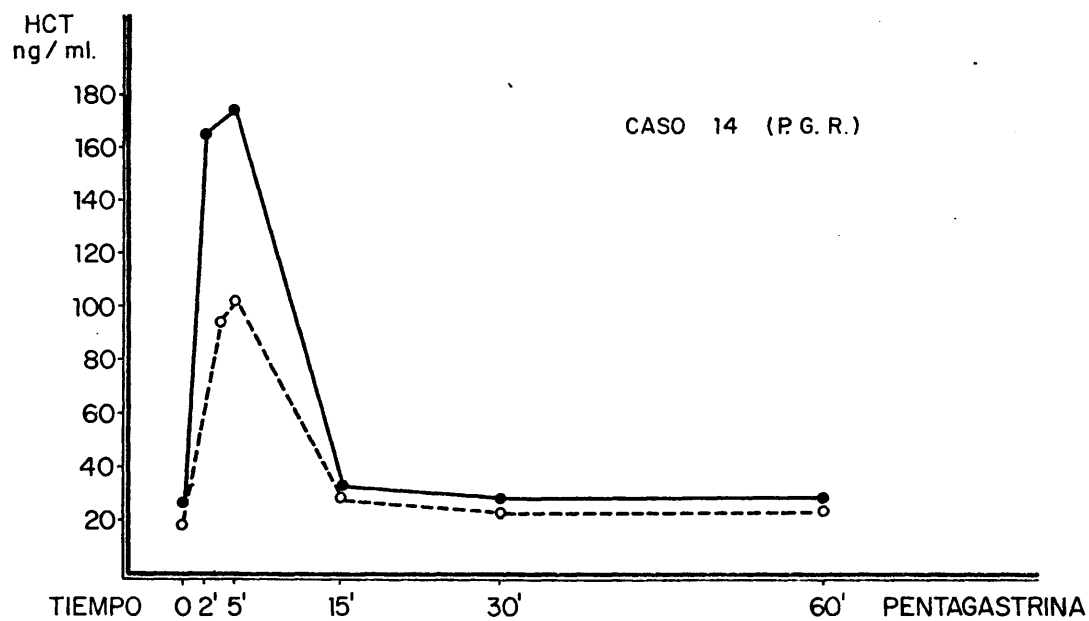
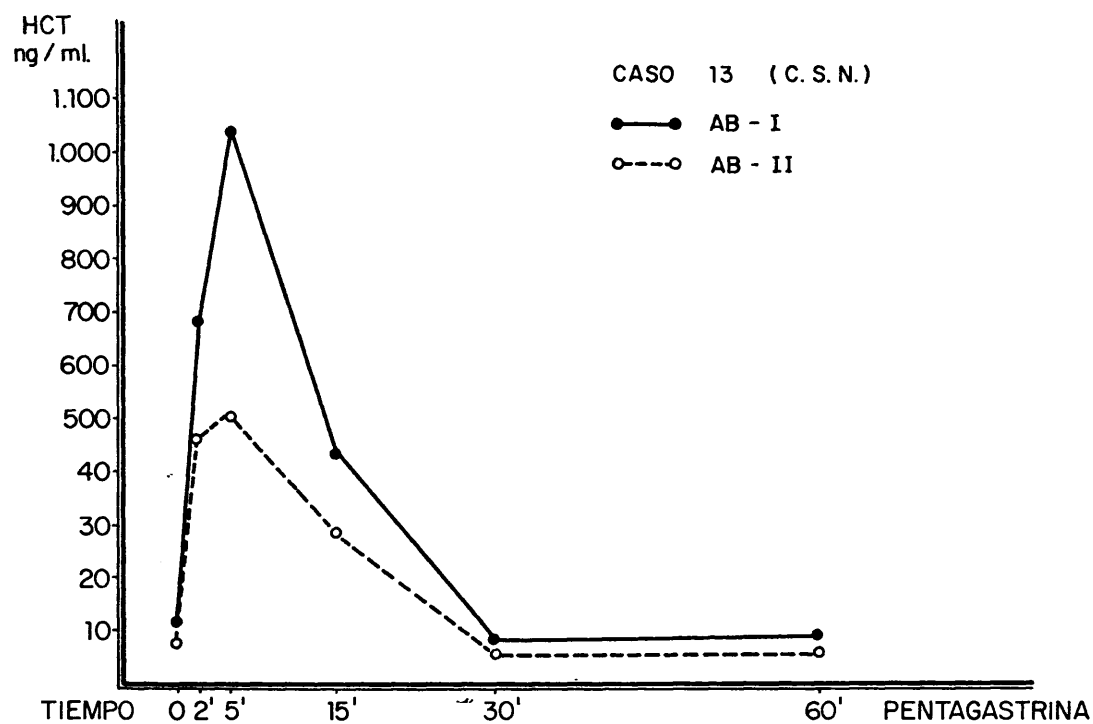


FIG. 26 - RESULTADO DE LA PRUEBA DE ESTIMULACION CON PENTAGASTRINA EN CARCINOMAS MEDULARES TI-ROIDEOS.

DE SUEROS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS (CMT), BASALES.

(Fracciones de 1 ml).

CASO 8, (L.B.M.)

HCT basal: 280 ng/ml (AB-I)... HCT basal: 144 ng/ml (AB-II).

Se eluyeron 2 ml de suero.

<u>Fracción</u> <u>n°</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>n°</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>n°</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>n°</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
28	0.32	39	0.30	28	0.40	41	0.40
29	1.50	40	1.88	29	1.56	42	2.15
30	2.46	41	3.53	30	2.15	43	2.51
31	2.92	42	3.76	31	2.40	44	1.93
32	2.49	43	3.69	32	1.65	45	0.60
33	1.52	44	2.56	33	0.52	46	0.30
34	0.81	45	1.89	Pico III		Pico IV	
35	0.22	46	0.95	70	0.37	79	0.25
Pico III		47	0.55	71	0.95	80	3.75
64	1.40	Pico IV		72	5.01	81	8.30
65	2.35	80	3.15	73	5.45	82	13.00
66	5.10	81	5.60	74	4.40	83	15.00
67	7.95	82	10.50	75	1.40	84	15.00
68	12.30	83	16.00	76	0.30	85	12.00
69	18.15	84	17.00	Pico V		86	16.20
70	24.00	85	16.50	90	1.90	87	3.14
71	25.00	86	10.00	91	4.70	88	1.20
72	26.00	87	7.00	92	11.00		
73	25.00	88	2.92	93	20.00		
74	24.00	89	1.00	94	25.00		
75	23.00	Pico V		95	27.00		
76	17.50	90	4.10	96	26.00		
77	10.20	91	8.70	97	20.00		
78	6.50	92	12.00	98	8.50		
79	2.83	93	15.00	99	3.75		
		94	19.00	100	1.96		
		95	19.00	101	0.86		
		96	19.00	102	0.33		
		97	18.00				
		98	11.00				
		99	2.45				
		100	0.80				
		101	0.15				

Pico I: 12.24 ng (2.6%).

Pico II: 19.11 ng (3.9%).

Pico III: 231.28 ng (47.2%).

Pico IV: 89.67 ng (18.3%).

Pico V: 137.2 ng (28%).

HCT eluida: 560 ng.

HCT recuperada (picos I-V):
490 ng (87.5%).

Pico I: 8.68 ng (3.3%).

Pico II: 7.89 ng (3.0%).

Pico III: 17.88 ng (6.8%).

Pico IV: 77.84 ng (29.6%).

Pico V: 151 ng (57.3%).

HCT eluida: 288 ng.

HCT recuperada (picos I-V):
263.3 ng (91.3%).

CASO 9, (M.A.J.N).

HCT basal: 290 ng/ml (AB-I).. HCT basal: 185 ng/ml (AB-II).
Se eluyeron 2 ml de suero.

Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
27	0.65	38	0.77	28	0.66	39	0.55
28	3.30	39	1.26	29	5.69	40	1.10
29	5.55	40	3.85	30	5.09	41	3.79
30	5.05	41	5.01	31	5.95	42	4.10
31	4.60	42	4.61	32	1.65	43	4.05
32	1.09	43	1.86	33	0.76	44	1.10
33	0.90	44	0.60	34	0.20	45	0.31
34	0.30	Pico IV		Pico III		Pico IV	
Pico III		80	1.60	69	0.55	82	0.60
64	2.00	81	2.33	70	2.24	83	4.10
65	2.90	82	6.40	71	5.75	84	10.00
66	4.75	83	9.50	72	5.85	85	18.00
67	7.60	84	16.50	73	5.86	86	19.00
68	12.50	85	15.50	74	2.35	87	18.50
69	18.50	86	16.00	75	0.90	88	4.80
70	22.50	87	8.80	76	0.50		
71	23.50	88	4.30	Pico V			
72	24.00	Pico V		89	5.30	ng/ml	
73	24.00	89	4.92	90	7.50		
74	23.50	90	6.10	91	11.50		
75	21.50	91	9.50	92	16.00		
76	16.50	92	15.00	93	19.50		
77	9.70	93	19.00	94	25.00		
78	3.00	94	22.00	95	27.00		
79	1.45	95	24.00	96	27.00		
		96	24.50	97	26.50		
		97	23.50	98	22.50		
		98	21.00	99	12.50		
		99	14.00	100	6.50		
		100	7.50	101	3.90		
		101	4.90	102	1.00		
		102	1.35	103	0.30		
		103	0.23				

Pico I: 21.44 ng (4.0%).
Pico II: 17.96 ng (3.35%).
Pico III: 218 ng (40.7%).
Pico IV: 80.93 ng (15.1%).
Pico V: 197.5 ng (36.85%).
HCT eluida: 580 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
536 ng (92.4%).

Pico I: 20 ng (5.78%).
Pico II: 15.0 ng (4.33%).
Pico III: 24 ng (6.93%).
Pico IV: 75 ng (21.67%).
Pico V: 212 ng (61.29%).
HCT eluida: 370 ng.
HCT recuperada (picos I a V)
346 ng (93,51%).

TABLA 9a, (Continuación). FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100
DE SUEROS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS; BASALES.

CASO 10, (S.C.P).

HCT basal: 73 ng/ml (AB-I)...
Se eluyeron 2 ml de suero.

HCT basal: 49.5 ng/ml (AB-II)

<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
29	0.20	38	0.15	30	0.25	39	0.30
30	0.86	39	0.85	31	1.15	40	0.80
31	1.05	40	1.46	32	1.00	41	0.90
32	1.10	41	1.32	33	0.20	42	0.75
33	0.45	42	0.79			43	0.20
34	0.23	43	0.25				
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
66	0.20	82	0.55	70	0.50	81	1.00
67	1.65	83	3.49	71	1.75	82	1.70
68	5.31	84	6.00	72	1.80	83	3.40
69	7.00	85	6.00	73	1.70	84	6.30
70	8.50	86	5.95	74	0.55	85	6.15
71	9.00	87	3.18			86	6.05
72	8.90	88	0.69			87	3.00
73	5.80	Pico V				88	1.55
74	3.00	89	1.30	Pico V			
75	1.87	90	2.65	89	2.10		
76	0.49	91	5.16	90	3.40		
		92	8.50	91	5.90		
		93	9.30	92	8.50		
		94	9.40	93	8.00		
		95	6.90	94	8.50		
		96	2.85	95	6.50		
		97	1.20	96	3.90		
		98	0.25	97	2.30		
		99	0.19	98	1.00		
				99	0.65		
				100	0.25		

Pico I: 3.89 ng (2.9%).
Pico II: 4.82 ng (3.6%).
Pico III: 51.72 ng (38.60%).
Pico IV: 25.86 ng (19.3%).
Pico V: 47.70 ng (35.6%).

HCT teóricamente eluida:
146 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
134 ng (91.78%).

Pico I: 2.60 ng (2.82%).
Pico II: 2.95 ng (3.20%).
Pico III: 6.30 ng (6.84%).
Pico IV: 29.15 ng (31.68%).
Pico V: 51 ng (55.43%).

HCT teóricamente eluida:
99 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
92 ng (92.9%).

TABLA 9a, (continuación). FRACCIONAMIENTOS EN SEPIADEX G-100 DE SUEROS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS.

Caso 11, (P.A.G).

HCT basal: 31 ng/ml (AB-I).. HCT basal: 22 ng/ml (AB-II).

Se eluyeron 2 ml de suero.

<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>
n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
29	0.395	39	0.205	29	0.50	39	0.40
30	0.62	40	0.88	30	0.85	40	1.00
31	0.52	41	0.75	31	0.40	41	0.85
		42	0.34			42	0.35
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
67	0.52	82	0.30	70	0.50	82	0.51
68	1.06	83	1.10	71	0.75	83	1.65
69	2.18	84	1.86	72	1.43	84	2.45
70	4.26	85	2.18	73	0.67	85	2.44
71	4.55	86	2.04	74	0.30	86	2.15
72	4.72	87	1.20			87	1.60
73	3.93	88	0.60			88	0.70
74	1.63					89	0.30
75	0.74	Pico V		Pico V			
76	0.25	90	0.41	91	0.43 ng/ml		
		91	0.88	92	1.66		
		92	2.46	93	4.16		
		93	4.35	94	4.51		
		94	4.40	95	4.76		
		95	4.25	96	2.98		
		96	1.92	97	1.47		
		97	1.15	98	0.51		
		98	0.89	99	0.22		
		99	0.45				
		100	0.215				

Pico I: 1.335 ng (2.3%).
Pico II: 2.175 ng (3.75%).
Pico III: 23.84 ng (41.10%).
Pico IV: 9.28 ng (16%).
Pico V: 21.375 ng (36.85%).

HCT teóricamente eluida:
62 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
58 ng (93.5%).

Pico I: 1.75 ng (4.32%).
Pico II: 2.60 ng (6.42%).
Pico III: 3.65 ng (9.01%).
Pico IV: 11.80 ng (29.13%).
Pico V: 20.70 ng (51.11%).

HCT teóricamente eluida:
44 ng.

HCT recuperada (picos I a V)
40.5 ng (92.0%).

TABLA 9a, (continuación). FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100
DE SUEROS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS, BASALES.

CASO 12, (M.E.A.G).

HCT basal: 6 ng/ml (AB-I).. HCT basal: 4.3 ng/ml (AB-II).
Se eluyeron 3 ml de suero.

<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>
<u>n°</u>	<u>ng/ml</u>	<u>n°</u>	<u>ng/ml</u>	<u>n°</u>	<u>ng/ml</u>	<u>n°</u>	<u>ng/ml</u>
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
29	0.16	42	0.18	29	0.13	42	0.11
30	0.155	43	0.165	30	0.13	43	0.20
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
69	0.25	82	0.29	71	0.29	82	0.22
70	0.68	83	0.66	72	0.41	83	0.51
71	1.20	84	0.58	73	0.23	84	0.66
72	1.25	85	0.55			85	0.51
73	1.12					86	0.35
74	0.85	Pico V		Pico V			
75	0.68	91	0.15	91	0.16 ng/ml		
76	0.39	92	0.68	92	0.45		
77	0.21	93	1.25	93	0.92		
		94	1.49	94	1.45		
		95	1.47	95	1.42		
		96	1.20	96	1.26		
		97	0.64	97	1.05		
		98	0.42	98	0.77		
				99	0.35		
				100	0.20		

Pico I: 0.315 ng (1.9%).
Pico II: 0.345 ng (2.1%).
Pico III: 6.63 ng (40.2%).
Pico IV: 2.08 ng (12.6%).
Pico V: 7.3 ng (44.2%).

HCT teóricamente eluida:
18 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
16.67ng (92.61%).

Pico I: 0.26 ng (2.2%).
Pico II: 0.41 ng (3.48%).
Pico III: 0.83 ng (7.04%).
Pico IV: 2.25 ng (19.1%).
Pico V: 8.03 ng (68.16%).

HCT teóricamente eluida:
12.9 ng.

HCT recuperada (picos I a V)
11.78 ng (91.3%).

CASO 13, (C.S.N).

HCT basal: 110 ng/ml (AB-I)... HCT: 76 ng/ml (AB-II).

Se eluyeron 2 ml de suero.

<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
29	0.41	40	0.27	29	0.44	41	0.40
30	0.73	41	0.56	30	0.90	42	0.85
31	0.98	42	1.20	31	1.11	43	1.00
32	0.91	43	1.25	32	1.05	44	1.10
33	0.83	44	1.15	33	0.73	45	0.70
34	0.40	45	0.65	34	0.40	46	0.20
Pico III		46	0.20				
65	0.31	Pico IV		Pico III		Pico IV	
66	0.89	80	0.40	69	0.25	81	0.25
67	1.25	81	0.83	70	0.70	82	0.96
68	5.90	82	2.55	71	1.65	83	3.68
69	7.50	83	6.19	72	1.66	84	5.95
70	8.50	84	6.25	73	1.63	85	5.60
71	9.00	85	5.60	74	0.91	86	5.45
72	9.50	86	2.97	75	0.60	87	4.90
73	9.00	87	2.11			88	2.41
74	6.20	Pico V		Pico V			
75	3.45	88	2.56	89	2.69		
76	1.10	89	3.25	90	4.15		
77	0.53	90	5.55	91	7.60		
		91	7.25	92	12.00		
		92	10.50	93	15.00		
		93	14.00	94	16.00		
		94	15.00	95	15.50		
		95	15.50	96	13.00		
		96	15.00	97	7.20		
		97	8.40	98	2.55		
		98	3.60	99	1.33		
		99	1.35	100	0.65		
		100	0.78	101	0.43		
		101	0.52				
		102	0.17				

Pico I: 4.26 ng (2.1%).

Pico II: 5.28 ng (2.6%).

Pico III: 63.13 ng (31.1%).

Pico IV: 26.9 ng (13.25%).

Pico V: 103.43 ng (50.95%).

HCT teóricamente eluida:

220 ng.

HCT recuperada (picos I a V):

203 ng (92.3%).

Pico I: 4.63 ng (3.2%).

Pico II: 4.25 ng (2.95%).

Pico III: 7.4 ng (5.14%).

Pico IV: 29.2 ng (20.27%).

Pico V: 98.5 ng (68.4%).

HCT teóricamente eluida:

152 ng.

HCT recuperada (picos I a V)

144 ng (94.7%).

CASO 14, (P.G.R.).

HCT basal: 23 ng/ml (AB-I)... HCT basal: 19.5 ng/ml (AB-II).
Se eluyeron 2 ml de suero.

Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
29	0.38	41	0.21	29	0.31	41	0.29
30	0.57	42	0.69	30	0.64	42	0.61
31	0.41	43	0.24	31	0.61	43	0.45
32	0.23			32	0.47	44	0.30
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
69	0.475	83	0.20	70	0.20	82	0.41
70	1.31	84	0.48	71	0.86	83	0.95
71	3.00	85	1.90	72	1.05	84	1.59
72	3.16	86	2.05	73	0.84	85	1.65
73	3.15	87	2.03	74	0.25	86	1.60
74	1.83	88	1.42			87	1.10
75	0.49	89	0.39			88	0.55
Pico V				Pico V			
90	0.60 ng/ml			89	0.69 ng/ml		
91	0.95			90	1.12		
92	1.56			91	2.25		
93	2.60			92	3.45		
94	3.75			93	4.00		
95	3.60			94	4.20		
96	3.00			95	3.95		
97	1.36			96	1.17		
98	0.71			97	0.49		
99	0.29			98	0.37		
100	0.20			99	0.28		
				100	0.13		

Pico I: 1.59 ng (3.7%).
Pico II: 1.14 ng (2.65 %).
Pico III: 13.415 ng (31.2%).
Pico IV: 8.47 ng (19.7%).
Pico V: 18.37 ng (42.75%).

HCT teóricamente eluida:
46 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
43 ng (93.5%).

Pico I: 2.03 ng (5.5%).
Pico II: 1.65 ng (4.47%).
Pico III: 3.3ng (8.94%).
Pico IV: 7.85 ng (21.27%).
Pico V: 22.1 ng (59.9%).

HCT teóricamente eluida:
39 ng.

HCT recuperada (picos Ia V):
36.9 ng (94.6%).

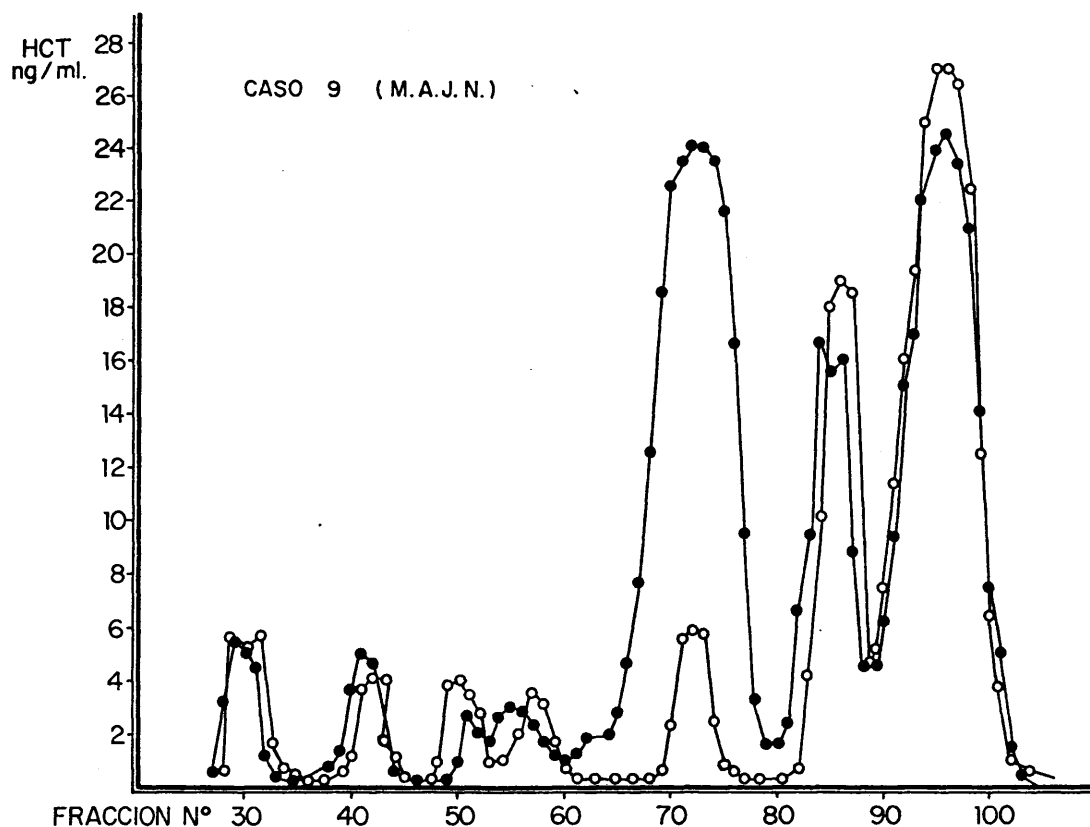
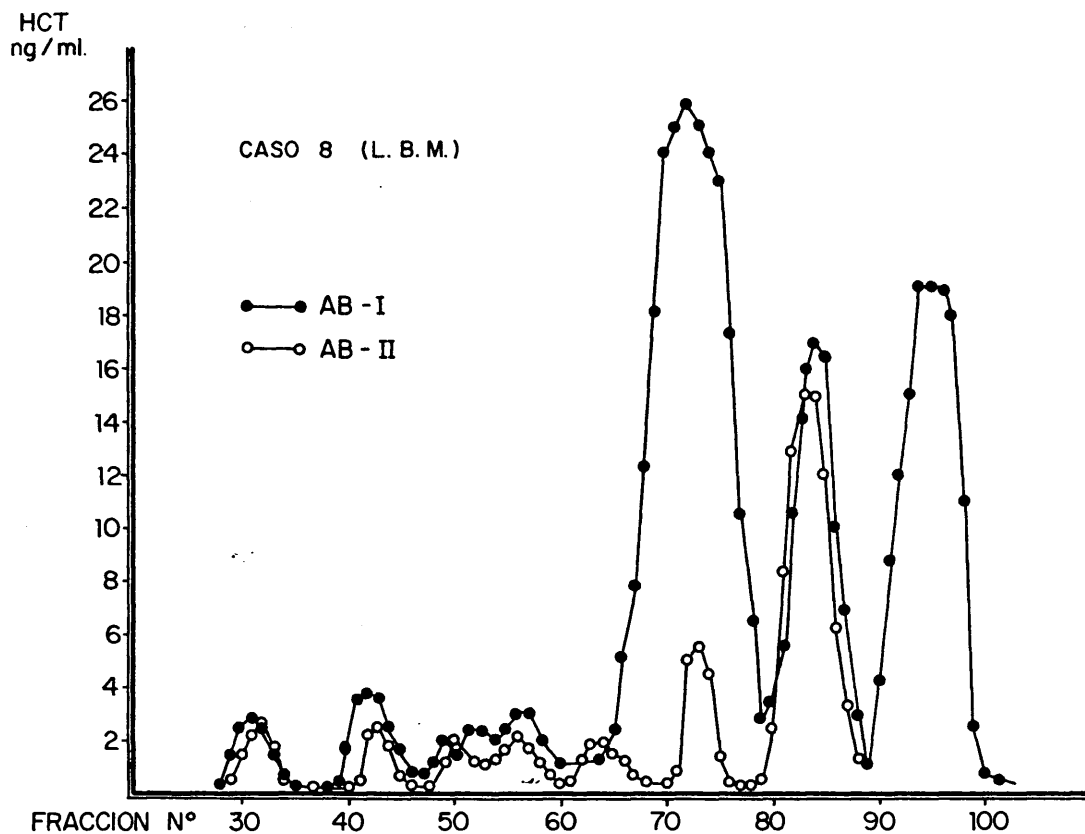


FIG. 27 - 1.- FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100 (COLUMNA 1.5x60cm.)
DE SUEROS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS (cMT),
BASALES. (FRACCIONES DE 1 ml.)

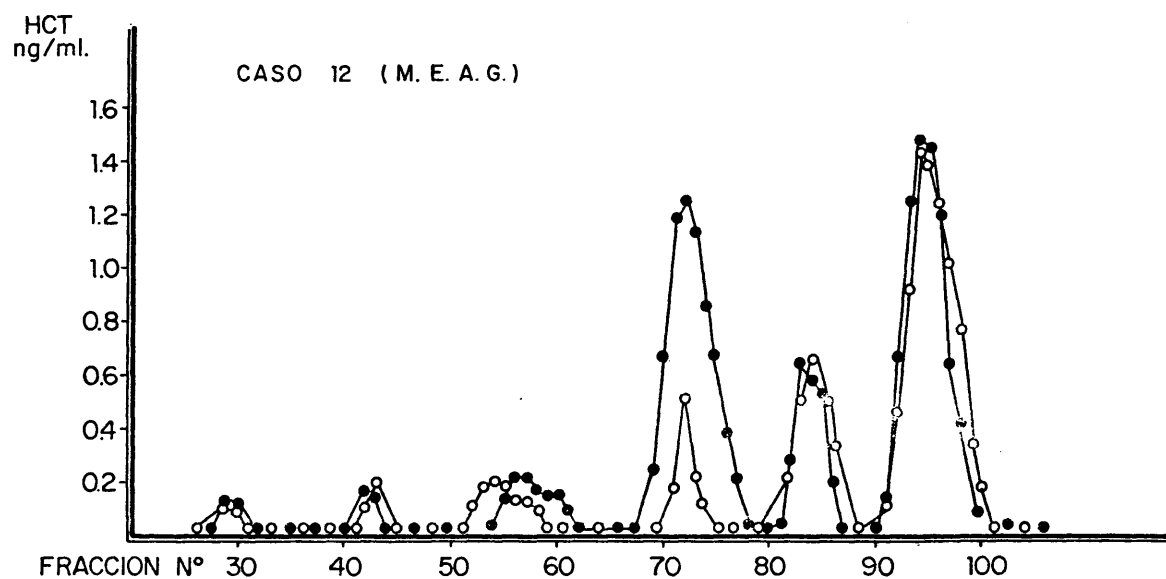
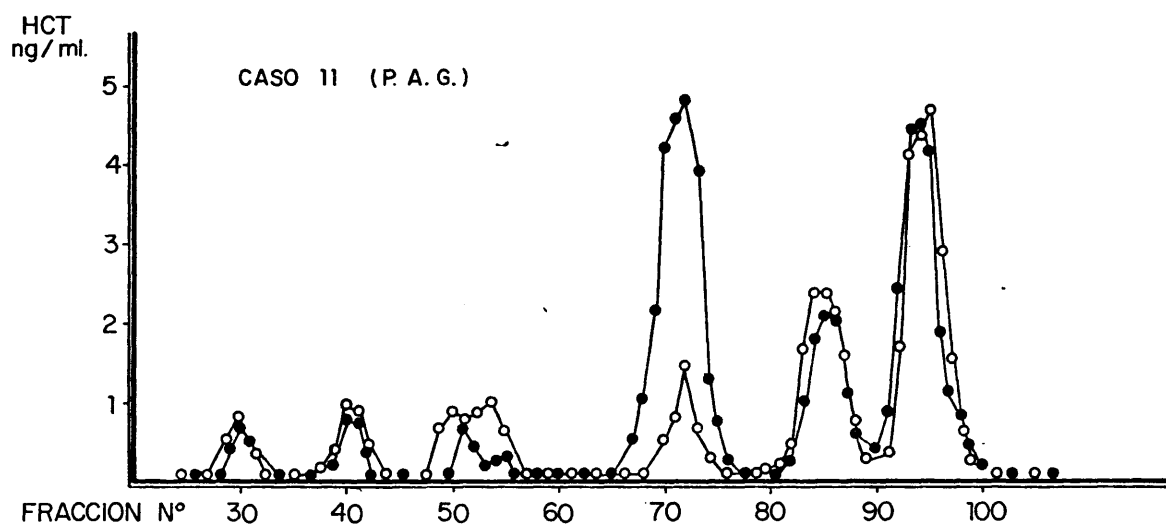
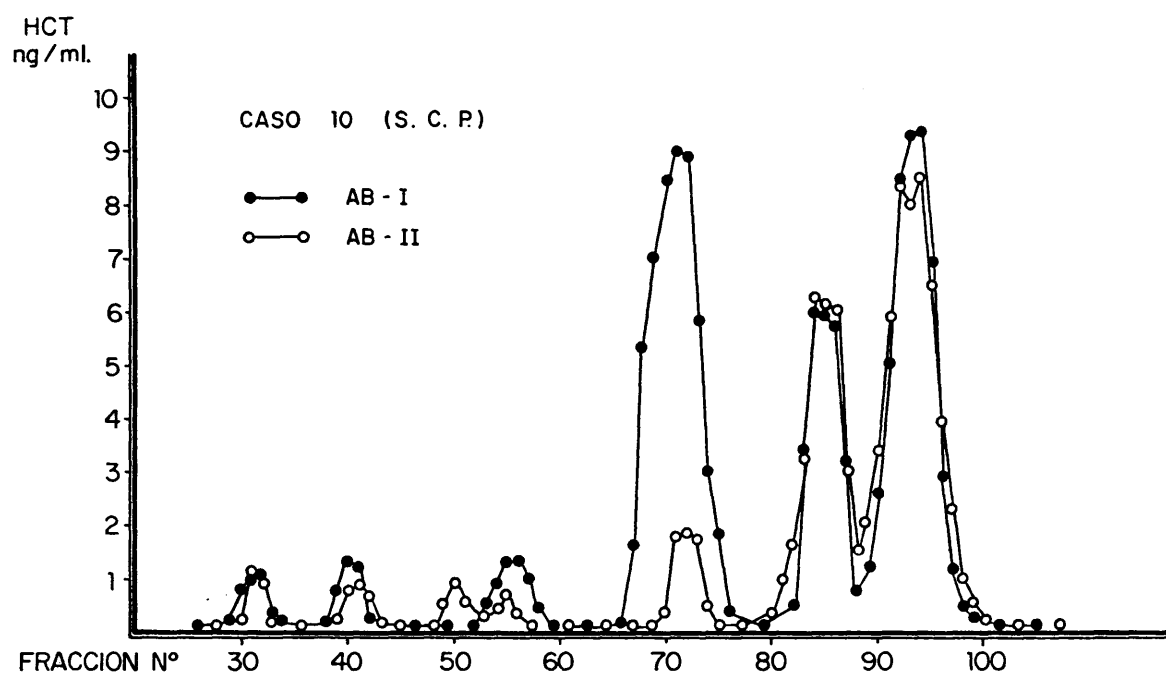


FIG. 27 - 2.- FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G.100 DE SUEROS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS, BASALES. (Continuación).

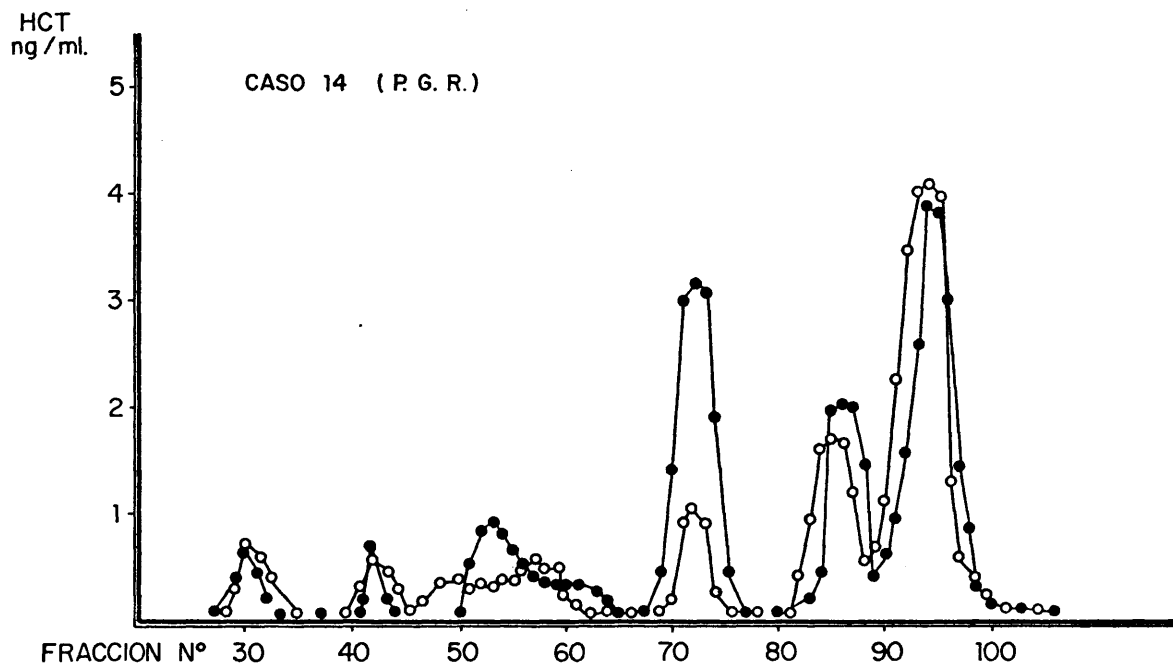
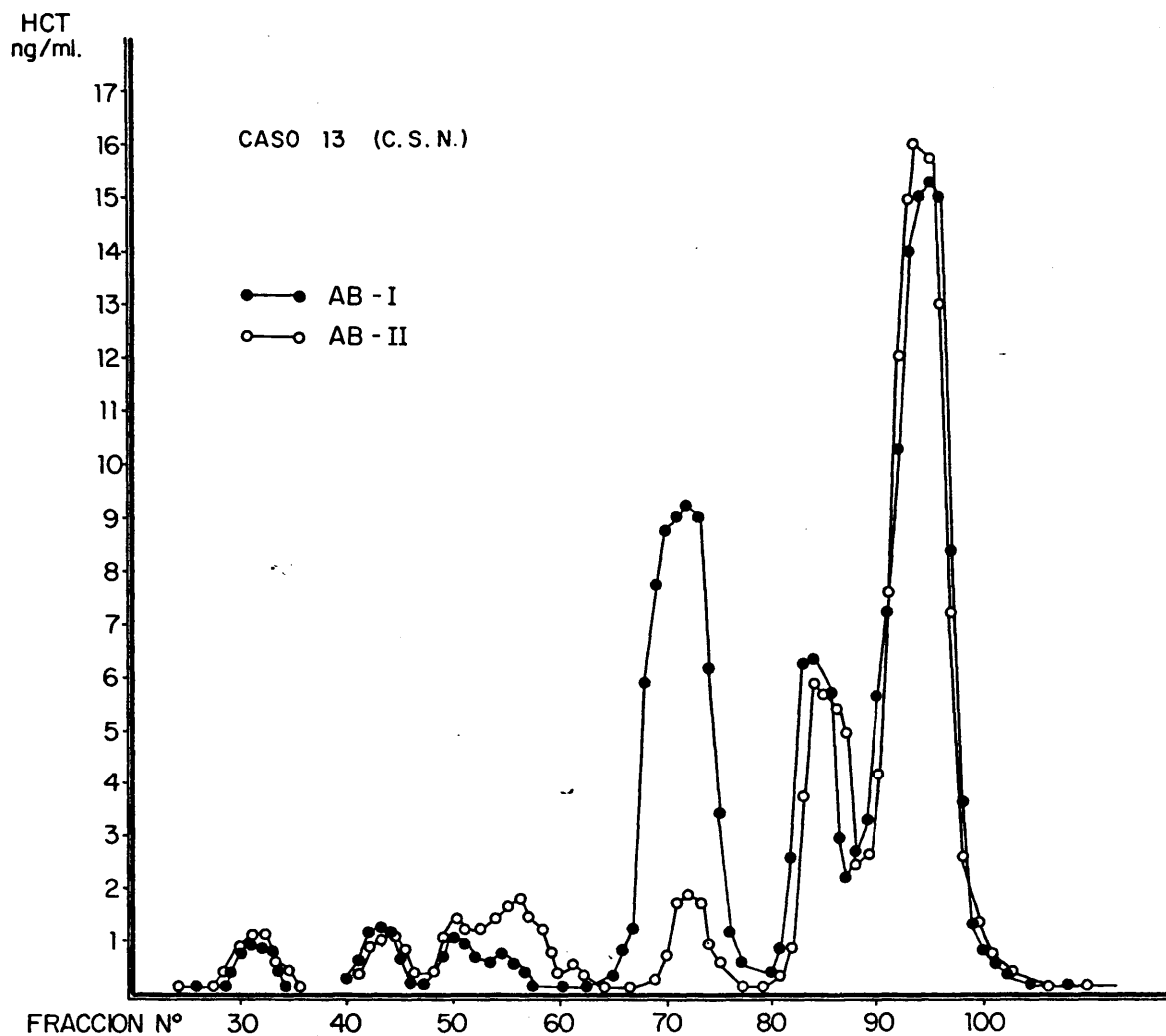


FIG. 27 -3.- FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G. 100 DE SUEROS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS. BASALES. (Continuación)

CASO 8, (L.B.M).

HCT basal: 280 ng/ml (AB-I).. HCT basal: 144 ng/ml (AB-II).
Se eluyeron 2 ml de suero.

<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
29	0.28	39	0.37	29	0.23	40	0.30
30	1.69	40	0.85	30	1.56	41	1.15
31	3.12	41	1.15	31	2.12	42	2.61
32	3.89	42	3.68	32	2.65	43	3.49
33	3.66	43	3.87	33	2.89	44	3.55
34	2.65	44	3.75	34	1.75	45	1.65
35	1.00	45	2.56	35	0.80	46	0.50
36	0.25	46	0.57	36	0.20		
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
65	0.25	82	2.90	69	0.56	83	0.40
66	1.95	83	2.96	70	2.15	84	1.45
67	4.25	84	3.45	71	3.60	85	1.60
68	12.00	85	4.00	72	3.82	86	1.68
69	17.50	86	3.45	73	3.95	87	1.47
70	23.00	87	2.15	74	1.65		
71	30.50	88	1.56	75	0.45		
72	31.00	Pico V		Pico V			
73	30.00	89	2.08	88	1.75		
74	28.50	90	6.10	89	4.12		
75	21.00	91	12.50	90	10.65		
76	15.50	92	19.00	91	18.50		
77	10.00	93	28.00	92	27.00		
78	6.50	94	32.50	93	34.50		
79	4.90	95	32.00	94	35.00		
80	3.35	96	31.00	95	34.50		
81	2.60	97	26.50	96	26.50		
		98	20.00	97	15.00		
		99	10.50	98	8.50		
		100	5.50	99	4.90		
		101	1.25	100	1.60		
		102	0.91	101	0.61		
		103	0.31	102	0.44		
		104	0.22	103	0.23		

Pico I: 16,54 ng (3.15%).
Pico II: 16.80 ng (3.2%).
Pico III: 242.8ng (46.25%).
Pico IV: 20.47 ng (3.9%).
Pico V: 228.37 ng (43.5%).

HCT teóricamente eluida:
560 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
525 ng (93.75%).

Pico I: 12.2 ng (4.48%).
Pico II: 13.25 ng (4.87%).
Pico III: 16.18ng (5.95%).
Pico IV: 6.6 ng (3.42%).
Pico V: 223.8 ng (82.28%).

HCT teóricamente eluida:
288 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
272 ng (94.4%).

TABLA 3D (CONTINUACIÓN). FRACCIÓNAMIENTOS EN SEPRADAX G-100
DE SUELOS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS, BASALES,
TRATADOS CON 2-MERCAPTOETANOL 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER
FOSFATO-UREA 8M.

CASO 9, (M.A.J.N).

HCT basal: 290 ng/ml (AB-I) .. HCT basal: 185 ng/ml (AB-II).
 Se eluyeron 2 ml de suero.

<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
28	0.20	39	0.60	28	0.35	39	0.35
29	1.70	40	2.19	29	1.10	40	1.25
30	4.90	41	3.90	30	4.69	41	3.15
31	4.75	42	5.95	31	4.40	42	3.72
32	4.66	43	5.85	32	4.10	43	3.55
33	2.40	44	3.95	33	2.32	44	2.62
34	0.43	45	1.06	34	1.04	45	1.50
35	0.30	46	0.11	35	0.20	46	0.36
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
65	0.40	80	1.96	68	0.45	80	0.40
66	1.25	81	2.12	69	0.80	81	0.56
67	9.70	82	2.50	70	2.20	82	1.43
68	9.50	83	3.63	71	3.85	83	2.75
69	14.50	84	3.90	72	4.12	84	3.05
70	26.00	85	1.90	73	4.03	85	3.10
71	30.50	86	1.40	74	2.80	86	1.51
72	30.00	Pico V		75	2.05	Pico V	
73	31.00	87	2.21	76	1.20	87	1.98
74	27.50	88	5.80	77	0.60	88	3.40
75	19.00	89	10.50			89	7.80
76	9.50	90	17.50			90	15.50
77	6.80	91	25.00			91	23.50
78	2.40	92	24.50			92	31.00
79	1.55	93	34.00			93	34.00
		94	33.50			94	33.00
		95	34.00			95	35.50
		96	31.00			96	35.00
		97	27.50			97	27.50
		98	19.50			98	20.00
		99	11.00			99	11.50
		100	7.50			100	6.50
		101	3.75			101	2.40
		102	1.20			102	1.65
		103	0.39			103	0.42
		104	0.15			104	0.25

Pico I: 19.34 ng (3.4%).
 Pico II: 23.61 ng (4.15%).
 Pico III: 219.6 ng (38.6%).
 Pico IV: 17.41 ng (3.06%).
 Pico V: 289 ng (50.79%).
 HCT eluida: 580 ng.
 HCT recuperada: 569 ng.
 (98.11%).

Pico I: 18.2 ng (5.04%).
 Pico II: 16.5 ng (4.57%).
 Pico III: 22.1 ng (6.12%).
 Pico IV: 12.9 ng (3.57%).
 Pico V: 291.3 ng (80.69%).
 HCT eluida: 370 ng.
 HCT recuperada: 361 ng.
 (97.57%).

CASO 10, (S.C.P).

HCT basal: 73 ng/ml (AB-I).. HCT basal: 49.5 ng/ml (AB-II).
 Se eluyeron 2 ml de suero.

<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
30	0.35	41	0.36	30	0.40	41	0.36
31	1.48	42	1.10	31	1.25	42	0.85
32	1.85	43	1.53	32	1.39	43	1.10
33	1.80	44	1.44	33	0.80	44	0.92
34	0.55	45	0.395	34	0.21	45	0.32
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
67	0.44	82	0.30	70	0.46	82	0.30
68	0.95	83	0.53	71	1.16	83	0.77
69	2.39	84	1.16	72	1.62	84	1.06
70	5.35	85	1.35	73	1.43	85	1.27
71	8.50	86	1.27	74	0.60	86	1.08
72	9.50	Pico V		75	0.37	Pico V	
73	9.00	87	1.69			87	1.45
74	9.00	88	2.35			88	2.20
75	6.35	89	3.50			89	3.68
76	2.34	90	5.00			90	6.50
77	1.45	91	7.00			91	7.25
78	0.66	92	7.50			92	8.00
79	0.27	93	8.50			93	8.50
		94	9.00			94	9.50
		95	9.00			95	9.00
		96	8.50			96	7.40
		97	4.10			97	5.90
		98	2.15			98	3.80
		99	1.16			99	2.55
		100	0.62			100	1.40
		101	0.18			101	0.85
						102	0.42
						103	0.37

Pico I: 6.03 ng (4.15%).
 Pico II: 4.825 ng (3.4%).
 Pico III: 56.2 ng (39.3%).
 Pico IV: 4.61 ng (3.25%).
 Pico V: 70.25 ng (49.5%).
 HCT teóricamente eluida:
 146 ng.
 HCT recuperada (picos I a V):
 142 ng (97.2%).

Pico I: 4.05 ng (4.2%).
 Pico II: 3.55 ng (3.68%).
 Pico III: 5.64 ng (5.85%).
 Pico IV: 4.48 ng (4.64%).
 Pico V: 78.77 ng (81.63%).
 HCT teóricamente eluida:
 99 ng.
 HCT recuperada (picos I a V):
 96.5 ng (97.47%).

TABLA 9b, (continuación). FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100
DE SUEROS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS, BASALES,
TRATADOS CON 2-MERCAPTOETANOL 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER
FOSFATO-UREA 8M.

CASO 11, (P.A.G).

HCT basal: 31 ng/ml (AB-I).. HCT basal: 22 ng/ml (AB-II).
 Se eluyeron 2 ml de suero.

<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
30	0.25	41	0.42	30	0.29	41	0.39
31	0.86	42	0.96	31	0.65	42	0.74
32	0.74	43	0.85	32	0.68	43	0.84
33	0.30	44	0.40	33	0.30	44	0.38
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
67	0.35	84	0.20	70	0.26	84	0.35
68	0.79	85	0.66	71	0.79	85	0.63
69	1.45	86	0.75	72	0.87	86	0.69
70	2.88	87	0.70	73	0.85	87	0.65
71	4.25	88	0.59	74	0.43	88	0.34
72	4.90	Pico V		Pico V		0.50 ng/ml.	
73	4.65						
74	3.10						
75	1.95						
76	0.62						
77	0.26						
		89	0.75	89	0.50	ng/ml.	
		90	1.45	90	0.94		
		91	2.56	91	1.61		
		92	3.15	92	2.96		
		93	4.00	93	5.35		
		94	4.25	94	6.00		
		95	4.10	95	5.80		
		96	3.50	96	4.40		
		97	2.45	97	2.90		
		98	1.00	98	1.60		
		99	0.26	99	0.45		
		100	0.15	100	0.31		

Pico I: 2.15 ng (3.57%).
 Pico II: 2.63 ng (4.35%).
 Pico III: 25.2 ng (41.65%).
 Pico IV: 2.9 ng (4.79%).
 Pico V: 27.62 ng (45.65%).

HCT teóricamente eluida:
 62 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
 60.5 ng (97.58%).

Pico I: 1.92 ng (4.47%).
 Pico II: 2.35 ng (5.47%).
 Pico III: 3.2 ng (7.45%).
 Pico IV: 2.66 ng (6.19%).
 Pico V: 32.82 ng (76.41%).

HCT teóricamente eluida:
 44 ng.

HCT recuperada (picos I a V)
 42.95 ng (97.61%).

TABLA 9b,(continuación). FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100
DE SUEROS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS,BASALES,
TRATADOS CON 2-MERCAPTOETANOL 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER
FOSFATO-UREA 8M.

CASO 12,(M.E.A.G).

HCT basal: 6 ng/ml (AB-I)... HCT absal:4.3 ng/ml (AB-II).
 Se eluyeron 3 ml de suero.

<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>
<u>n°</u>	<u>ng/ml</u>	<u>n°</u>	<u>ng/ml</u>	<u>n°</u>	<u>ng/ml</u>	<u>n°</u>	<u>ng/ml</u>
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
31	0.18	42	0.15	31	0.19	43	0.30
32	0.22	43	0.19	32	0.19	44	0.20
		44	0.12				
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
70	0.35	83	0.13	71	0.29	84	0.19
71	0.94	84	0.22	72	0.57	85	0.22
72	1.56	85	0.10	73	0.24		
73	2.75						
74	1.47	Pico V		Pico V			
75	0.75						
76	0.30	92	0.26	92	0.36	ng/ml	
		93	0.97	93	0.97		
		94	2.25	94	2.65		
		95	2.26	95	2.60		
		96	2.07	96	1.79		
		97	0.76	97	0.98		
		98	0.165	98	0.42		

Pico I: 0.4 ng (2.33%).
 Pico II: 0.46 ng (2.68%).
 Pico III: 7.12 ng (41.48%).
 Pico IV: 0.45 ng (2.62%).
 Pico V: 8.735 ng (50.89%).

HCT teóricamente eluida:
 18 ng.
 HCT recuperada (picos I a V):
 17.165 ng (95.36%).

Pico I: 0.38 ng (3.12%).
 Pico II: 0.50 ng (4.11%).
 Pico III: 1.1 ng (9.04%).
 Pico IV: 0.41 ng (3.37%).
 Pico V: 9.77 ng (80.34%).

HCT teóricamente eluida:
 12.9 ng.
 HCT recuperada (picos I a V)
 12.16 ng (94.26%).

TABLA 9B, (continuación). FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100
DE SUEROS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS, BASALES,
TRATADOS CON 2-MERCAPTOETANOL 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER
FOSFATO-UREA 8M.

CASO 13, (C.S.N).

HCT basal: 110 ng/ml (AB-I).. HCT basal: 76 ng/ml (AB-II).
 Se eluyeron 2 ml de suero.

<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
30	0.19	41	0.32	30	0.23	41	0.21
31	0.99	42	1.00	31	1.15	42	1.24
32	1.28	43	1.25	32	1.33	43	1.45
33	1.02	44	1.26	33	1.17	44	1.22
34	0.25	45	0.77	34	0.32	45	0.45
		46	0.35			46	0.13
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
66	0.30	82	0.42	69	0.16	82	0.35
67	0.95	83	0.93	70	0.35	83	0.77
68	1.45	84	1.22	71	1.45	84	1.25
69	3.75	85	1.05	72	1.62	85	1.06
70	7.50	86	0.43	73	1.49	96	0.37
71	9.50			74	0.86		
72	10.00	Pico V		75	0.32	Pico V	
73	10.00	87	0.92			87	0.62
74	8.50	88	1.86			88	1.26
75	7.50	89	3.25			89	3.65
76	2.90	90	7.65			90	7.90
77	1.85	91	12.50			91	12.50
78	0.65	92	16.00			92	12.00
79	0.31	93	17.00			93	16.00
		94	18.50			94	15.50
		95	18.00			95	15.50
		96	18.50			96	14.00
		97	13.00			97	10.50
		98	7.30			98	7.50
		99	2.36			99	5.80
		100	1.65			100	4.30
		101	0.49			101	1.30
		102	0.33			102	0.95
						103	0.46
						104	0.19

Pico I: 3.73 ng (1.72%).
 Pico II: 4.95 ng (2.28%).
 Pico III: 65.16 ng (30.0%).
 Pico IV: 4.05 ng (1.86%).
 Pico V: 139.31 ng (64.14%).

HCT teóricamente eluida:
 220 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
 217.2 ng (98,72%).

Pico I: 4.2 ng (2.82%).
 Pico II: 4.7 ng (3.15%).
 Pico III: 6.26 ng (4.19%).
 Pico IV: 3.8 ng (2.55%).
 Pico V: 129.93 ng (87.27%).

HCT teóricamente eluida:
 152 ng.

HCT recuperada:
 148.88 ng (97.95%).

TABLA 9b, (continuación y fin). FRACCIONAMIENTOS EN
SEPHADEX G-100 DE SUEROS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS,
BASALES, TRATADOS CON 2-MERCAPTOETANOL 3M Y ELUIDOS CON UN
BUFFER FOSFATO-UREA 8M.

CASO 14, (P.G.R.).

HCT basal: 23 ng/ml (AB-I).. HCT basal: 19.5 ng/ml (AB-II).
 Se eluyeron 2 ml de suero.

Fracción	HCT	Fracción	HCT	Fracción	HCT	Fracción	HCT
n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml	n°	ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
29	0.26	41	0.19	29	0.33	41	0.24
30	0.72	42	0.54	30	0.68	42	0.73
31	0.68	43	0.49	31	0.51	43	0.66
32	0.20	44	0.16	32	0.20	44	0.30
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
68	0.36	83	0.21	70	0.22	83	0.31
69	0.76	84	0.83	71	0.75	84	0.78
70	1.65	85	0.76	72	0.83	85	0.76
71	3.15	86	0.30	73	0.86	86	0.30
72	3.25	Pico V		74	0.39	Pico V	
73	3.20						
74	1.49	90	0.31			88	0.42
75	0.75	91	0.88			89	0.68
76	0.44	92	1.90			90	1.12
		93	2.95			91	2.17
		94	4.80			92	3.75
		95	4.65			93	4.80
		96	3.90			94	4.70
		97	2.76			95	4.15
		98	1.58			96	3.40
		99	0.31			97	2.35
		100	0.27			98	1.12
						99	0.57
						100	0.26

Pico I: 1.86 ng (4.16%).
 Pico II: 1.38 ng (3.09%).
 Pico III: 15.05 ng (33.67%).
 Pico IV: 2.1 ng (4.69%).
 Pico V: 24.31 ng (54.38%).

HCT teóricamente eluida:
 46 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
 44.7 ng (97.17%).

Pico I: 1.72 ng (4.48%).
 Pico II: 1.93 ng (5.03%).
 Pico III: 3.05 ng (7.95%).
 Pico IV: 2.15 ng (5.6%).
 Pico V: 29.49 ng (76.91%).

HCT teóricamente eluida:
 39 ng.

HCT recuperada (picos I a V)
 38.34 ng (98.3%).

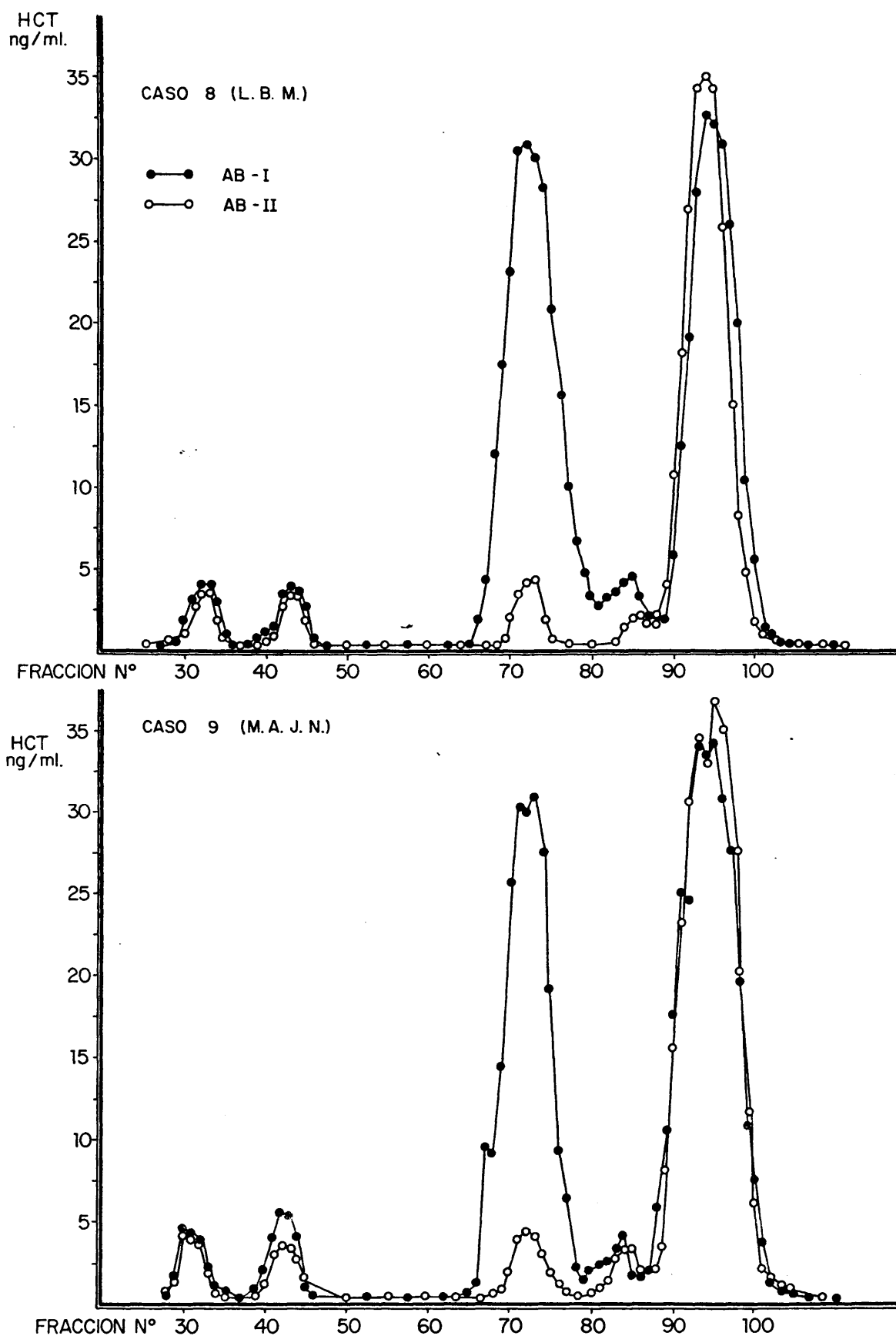


FIG. 28 - 1.- FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G. 100 DE SUEROS DE CMT BASALES TRATADOS CON 2 - ME 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO - UREA 8 M. (FRACCIONES DE 1 ml.)

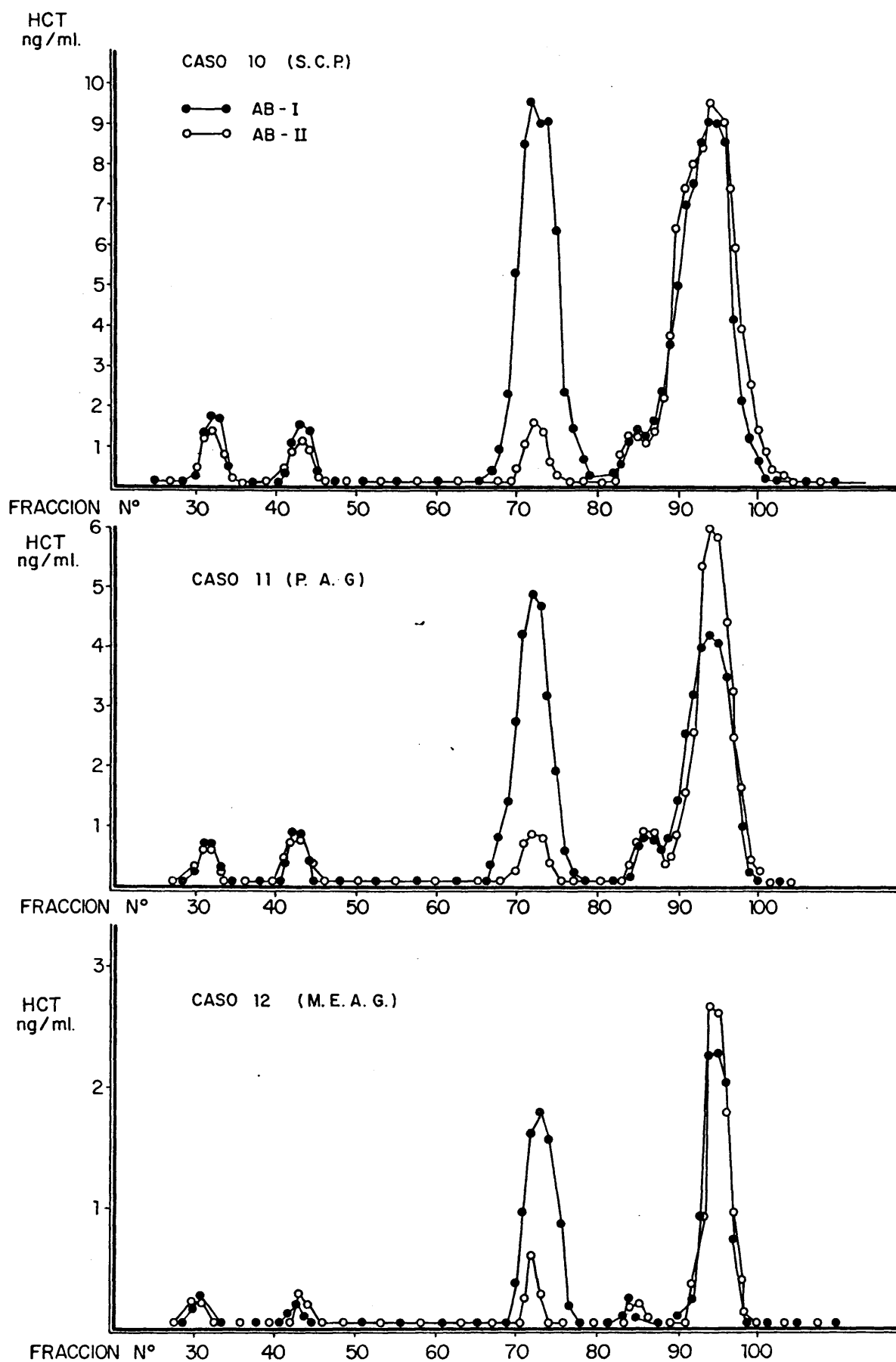


FIG. 28 - 2.- FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G.100 DE SUEROS DE CMT BASALES TRATADOS CON 2-ME 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO - UREA 8 M. (Continuación)

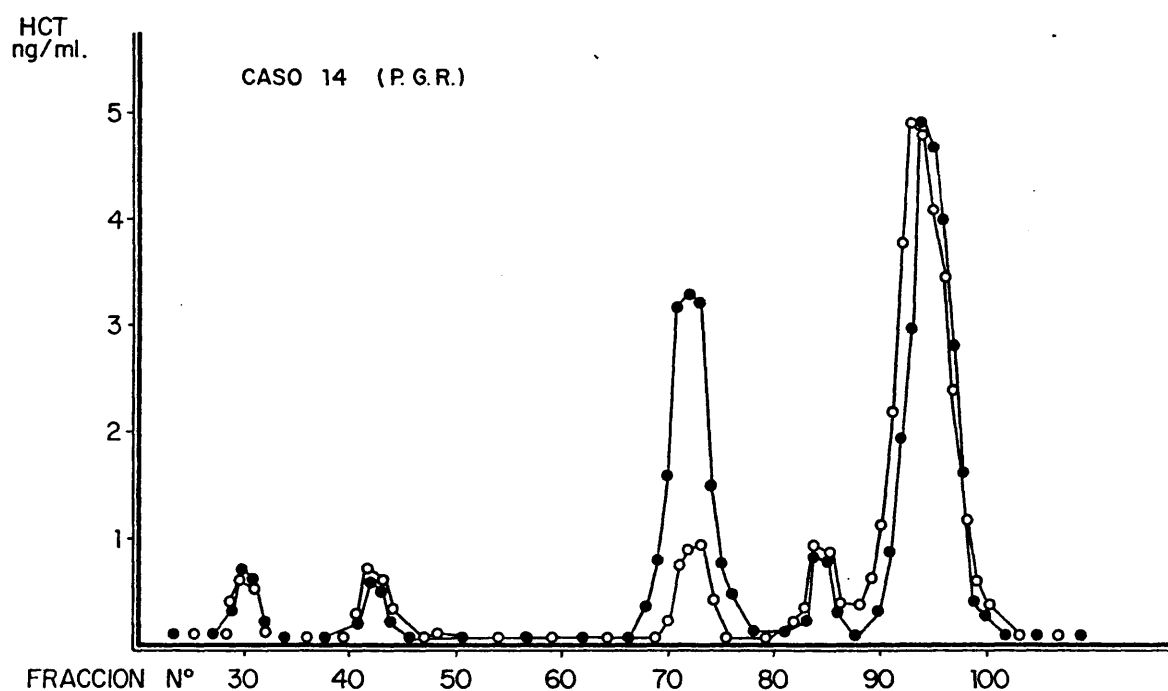
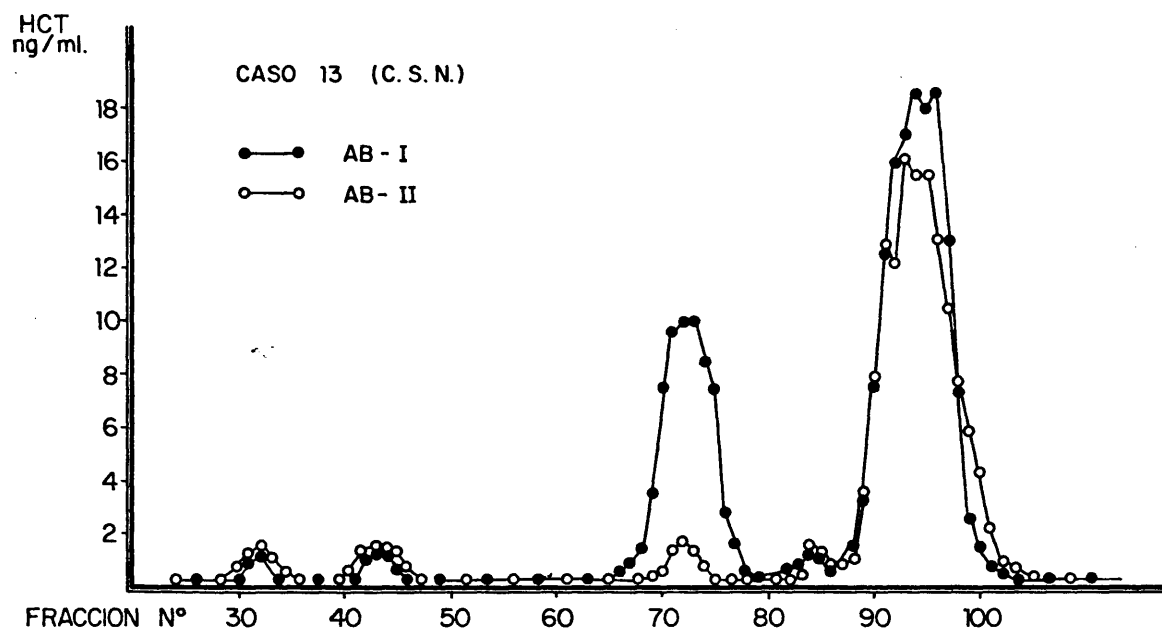


FIG. 28 - 3.- FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G.100 DE SUEROS DE CMT
BASALES TRATADOS CON 2 - ME 3 M Y ELUIDOS CON UN
BUFFER FOSFATO - UREA 8 M. (Continuación).

CASO 8, (L.B.M).

HCT basal: 619 ng/ml (AB-I).. HCT basal: 325 ng/ml (AB-II).
Se eluyó 1 ml de suero.

Fracción n°	HCT ng/ml	Fracción n°	HCT ng/ml	Fracción n°	HCT ng/ml	Fracción n°	HCT ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
29	0.26	39	0.34	30	0.40	39	0.25
30	1.03	40	0.75	31	0.85	40	1.10
31	2.17	41	1.25	32	1.75	41	1.70
32	2.32	42	2.27	33	2.10	42	2.45
33	1.19	43	2.59	34	1.17	43	2.70
34	0.57	44	1.30	35	0.43	44	1.60
35	0.20	45	0.51	36	0.20	45	0.45
36	0.20	46	0.18				
Pre-III		Pico III		Pre-III		Pico III	
55	0.40	67	5.18	56	0.27	70	0.45
56	0.63	68	12.00	57	1.45	71	1.70
57	1.66	69	20.50	58	3.80	72	3.10
58	4.18	70	29.00	59	8.40	73	2.75
59	9.20	71	34.00	60	14.00	74	1.75
60	15.50	72	33.00	61	14.00	75	0.55
61	17.00	73	33.50	62	14.50	76	0.20
62	16.50	74	29.50	63	12.50	Pico V	
63	15.50	75	20.50	64	7.50	88	2.00
64	6.50	76	13.50	65	3.10	89	3.90
65	3.81	77	9.50	66	1.16	90	2.75
66	2.62	78	5.20	67	0.32	91	8.50
Pico V		79	3.0	Pico IV		92	16.00
88	3.25	80	2.4	82	0.60	93	19.50
89	6.15	81	1.6	83	1.10	94	22.00
90	4.90	Pico IV		84	2.90	95	22.00
91	12.50	82	1.85	85	3.40	96	22.50
92	17.50	83	2.20	86	2.85	97	21.00
93	24.00	84	3.85	87	1.75	98	17.50
94	26.00	85	3.60			99	11.50
95	26.00	86	3.75			100	5.50
96	26.50	87	2.83			101	2.10
97	22.00					102	1.20
98	15.50					103	0.53
99	10.00					104	0.27
100	4.85						
101	1.77						
102	0.96						
103	0.50						

Pico I: 7.96 ng (1.36%).
Pico II: 9.19 ng (1.57%).
Pre-III: 93.5 ng (16.02%).
Pico III: 252.38 ng (43.26%).
Pico IV: 18.08 (3.1%).
Pico V: 202.38 ng (34.69%).
HCT eluida: 619 ng.
HCT recuperada: 583.4 ng.
(94.25%).

Pico I: 6.9 ng (2.3%).
Pico II: 10.25 ng (3.41%).
Pre-III: 81.0 ng (27.0%).
Pico III: 10.5 ng (3.5%).
Pico IV: 12.6 ng (4.2%).
Pico V: 178.75 ng (59.58%).
HCT eluida: 325 ng.
HCT recuperada: 300.0 ng.
(92.3%).

TABLA 9c, (continuación). FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100
DE SUEROS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS, TRAS INFUSION
DE CALCIO, TRATADOS CON 2-MERCAPTOETANOL 3M Y ELUIDOS CON
UN BUFFER FOSFATO-UREA 8M.

CASO 9, (M.A.J.N).

HCT: 725 ng/ml (AB-I).
 Se eluyó 1 ml de suero.

HCT: 467 ng/ml (AB-II).

Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
29	0.18	39	0.45	29	0.21	39	0.36
30	1.66	40	1.90	30	1.17	40	2.10
31	3.20	41	3.85	31	3.00	41	3.20
32	3.80	42	3.20	32	3.23	42	3.65
33	1.93	43	2.46	33	1.90	43	2.40
34	0.48	44	1.42	34	0.49	44	0.91
		45	0.92			45	0.58
Pre-III		Pico III		Pre-III		46	0.20
57	0.69	67	6.80			Pico III	
58	1.96	68	11.50	57	1.20	68	3.00
59	5.20	69	20.00	58	2.40	69	4.50
60	11.50	70	31.50	59	6.15	70	5.70
61	18.50	71	42.00	60	12.00	71	6.20
62	21.00	72	44.00	61	18.00	72	6.50
63	21.00	73	43.00	62	22.00	73	3.10
64	16.50	74	44.00	63	21.00	74	1.20
65	9.60	75	35.50	64	17.50	75	0.45
66	5.60	76	19.50	65	12.50	Pico V	
Pico V		77	7.40	66	9.50	85	2.60
83	1.15	78	1.90	67	2.50	86	4.50
84	1.76	Pico IV		Pico IV		87	6.20
85	2.90	79	2.10	80	0.31	88	9.50
86	3.50	80	2.45	81	1.65	89	15.50
87	7.60	81	2.75	82	2.24	90	19.50
88	10.00	82	0.89	83	2.00	91	23.50
89	12.50			84	1.70	92	29.50
90	17.00					93	31.50
91	25.50					94	32.50
92	32.00					95	32.00
93	31.00					96	28.00
94	33.50					97	14.00
95	33.00					98	11.50
96	25.50					99	3.50
97	10.50					100	2.90
98	3.60					101	1.10
99	2.00					102	0.40
100	1.20						
101	0.94						
102	0.16						

Pico I: 11.25 ng (1.59%).
 Pico II: 14.6 ng (2.06%).
 Pre-III: 111.55 ng (15.75%).
 Pico III: 307.1 ng (43.37%).
 Pico IV: 8.19 ng (1.15%).
 Pico V: 255.31 ng (36.06%).
 HCT eluida: 725 ng.
 HCT recuperada: 708 ng (97.6%).

Pico I: 10.0 ng (2.19%).
 Pico II: 13.4 ng (2.94%).
 Pre-III: 124.75 ng (27.42%).
 Pico III: 30.65 ng (6.73%).
 Pico IV: 7.9 ng (1.73%).
 Pico V: 268.2 ng (58.86%).
 HCT eluida: 467 ng.
 HCT recuperada: 455 ng (97.4%).

CASO 10, (S.C.P).

HCT: 425 ng/ml (AB-I).
 Se eluyó 1 ml de suero.

HCT: 275 ng/ml (AB-II).

Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
29	0.19	39	0.41	29	0.15	39	0.36
30	1.05	40	1.64	30	1.15	40	1.43
31	1.80	41	2.60	31	1.40	41	2.24
32	1.97	42	3.05	32	1.55	42	2.14
33	0.96	43	1.47	33	0.86	43	0.94
34	0.23	44	0.38	34	0.29	44	0.12
Pre-III		Pico III		Pre-III		Pico III	
56	0.40	67	5.20	56	0.30	71	0.61
57	1.95	68	6.40	57	1.95	72	2.30
58	3.60	69	11.50	58	5.10	73	5.50
59	9.40	70	17.50	59	9.90	74	5.40
60	14.50	71	24.50	60	12.50	75	4.50
61	14.00	72	25.50	61	13.50	76	2.49
62	14.00	73	25.00	62	14.50	77	2.25
63	12.50	74	16.50	63	13.50	78	1.15
64	9.50	75	21.50	64	12.00	79	0.35
65	6.90	76	14.00	65	7.50	Pico V	
65	4.80	77	10.00	66	3.10	86	1.50
Pico V		78	7.60	67	2.90	87	2.50
86	1.60	79	2.30	68	0.70	88	3.30
87	2.40	Pico IV		69	0.40	89	6.20
88	3.10	80	2.40	Pico IV		90	10.50
89	6.60	81	2.40	80	0.64	91	16.00
90	9.50	82	2.20	81	1.41	92	13.00
91	14.50	83	2.70	82	2.45	93	18.00
92	10.00	84	1.55	83	2.65	94	18.50
93	16.00	85	1.35	84	2.23	95	17.00
94	16.50			85	1.22	96	9.00
95	12.00					97	5.50
96	7.50					98	1.85
97	2.40					99	0.74
98	1.10					100	0.38
99	0.66						
100	0.24						

Pico I: 6.2 ng (1.5%).
 Pico II: 9.55 ng (2,32%).
 Pre-III: 91.55 ng (22.24%).
 Pico III: 187.50 ng (45.56%).
 Pico IV: 12.60 ng (3.06%).
 Pico V: 104.1 ng (25.3%).
 HCT teóricamente eluida:
 425 ng.
 HCT recuperada (picos I a V):
 411.5 ng (96.8%).

Pico I: 5.4 ng (2.0%).
 Pico II: 7.23 ng (2.68%).
 Pre-III: 97.85 ng (36.29%).
 Pico III: 24.55 ng (9,10%).
 Pico IV: 10.6 ng (3.93%).
 Pico V: 123.97 ng (45.98%).
 HCT teóricamente eluida:
 275 ng.
 HCT recuperada (picos I a V)
 269.6 ng (98.03%).

CASO 11, (P.A.G.)

HCT: 120 ng/ml (AB-I).

HCT: 86 ng/ml (AB-II).

Se eluyeron 2 ml de suero.

Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
28	0.41	40	0.29	28	0.30	40	0.17
29	0.96	41	1.15	29	1.25	41	1.15
30	1.55	42	3.20	30	1.95	42	2.80
31	2.00	43	3.00	31	1.70	43	3.00
32	1.16	44	1.22	32	0.74	44	1.31
33	0.32	45	0.29	33	0.21	45	0.27
Pre-III		Pico III		Pre-III		Pico III	
58	0.32	67	2.00	58	0.30	68	1.30
59	1.86	68	2.90	59	1.20	69	1.45
60	5.50	69	4.50	60	6.50	70	1.85
61	8.50	70	9.50	61	10.00	71	2.60
62	10.00	71	14.50	62	10.50	72	2.80
63	10.00	72	16.00	63	10.50	73	2.40
64	6.00	73	15.00	64	8.00	74	1.50
65	3.40	74	15.50	65	4.50	75	0.60
66	1.68	75	8.00	66	2.20	Pico V	
Pico V		76	4.10	67	1.20	88	1.20
88	1.20	77	1.60	Pico IV		89	1.90
89	2.30	78	0.73	82	0.29	90	3.30
90	3.50	79	0.22	83	0.95	91	5.50
91	5.30	Pico IV		84	2.32	92	8.00
92	7.00	82	0.71	85	2.00	93	11.50
93	10.00	83	1.26	86	1.35	94	12.00
94	10.50	84	2.21	87	0.94	95	12.00
95	10.00	85	2.39			96	9.50
96	8.00	86	1.40			97	6.10
97	4.50	87	0.69			98	2.30
98	1.10					99	0.81
99	0.29					100	0.39
100	0.29						

Pico I: 6.4 ng (2.78%).

Pico II: 9.15 ng (3.98%).

Pre-III: 47.26 ng (20.55%).

Pico III: 94.55 ng (41.1%).

Pico IV: 8.66 ng (3.76%).

Pico V: 63.98 ng (21.81%).

HCT teóricamente eluida:

240 ng.

HCT recuperada (picos I a V):

230 ng (95.8%).

Pico I: 6.15 ng (3.7%).

Pico II: 8.70 ng (5.23%).

Pre-III: 54.9 ng (33.02%).

Pico III: 14.5 ng (8.72%).

Pico IV: 7.85 ng (4.72%).

Pico V: 74.15 ng (44.6%).

HCT teóricamente eluida:

172 ng.

HCT recuperada (picos I-V)

166.25 ng (96.6%).

CASO 12, (M.E.A.G).

HCT: 14.6 ng/ml (AB-I).

HCT: 11.2 ng/ml (AB-II).

Se eluyeron 3 ml de suero.

Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
29	0.15	41	0.20	29	0.20	41	0.35
30	0.25	42	0.60	30	0.65	42	1.00
31	0.56	43	0.95	31	0.65	43	0.80
32	0.45	44	0.55	32	0.30	44	0.35
33	0.39	45	0.30	33	0.20	45	0.20
Pre-III		Pico III		Pre-III		Pico III	
59	0.24	68	0.40	59	0.55	71	0.49
60	0.80	69	0.90	60	1.45	72	0.85
61	1.25	70	1.20	61	2.10	73	0.75
62	1.48	71	2.80	62	2.20	74	0.31
63	1.35	72	4.00	63	1.22		
64	1.16	73	3.80	64	0.64		
65	0.55	74	3.10	65	0.20	Pico V	
66	0.23	75	1.55			91	0.29
67	0.19	76	0.39	Pico IV		92	1.10
		77	0.21	84	0.45	93	2.30
Pico IV		Pico V		85	0.80	94	2.46
83	0.30	91	0.26	86	0.65	95	2.55
84	0.66	92	0.91	87	0.20	96	1.26
85	0.80	93	2.00			97	0.53
86	0.47	94	2.30			98	0.31
87	0.17	95	2.20			99	0.20
		96	0.87				
		97	0.55				
		98	0.31				
		99	0.195				

Pico I: 1.8 ng (4.29%).
 Pico II: 2.6 ng (6.2%).
 Pre-III: 7.25 ng (17.3%).
 Pico III: 18.35 ng (43.8%).
 Pico IV: 2.4 ng (5.72%).
 Pico V: 9.495 ng (22.66%).

HCT teóricamente eluida:
43.8 ng.

HCT recuperada (picos I a V):
41.895 ng (95.6%).

Pico I: 2.0 ng (7.0%).
 Pico II: 2.7 ng (9.45%).
 Pre-III: 8.36 ng (29.27%).
 Pico III: 2.4 ng (8.4%).
 Pico IV: 2.1 ng (7.35%).
 Pico V: 11.0 ng (38.51%).

HCT teóricamente eluida:
33.6 ng.

HCT recuperada (picos I-V):
28.56 ng (85%).

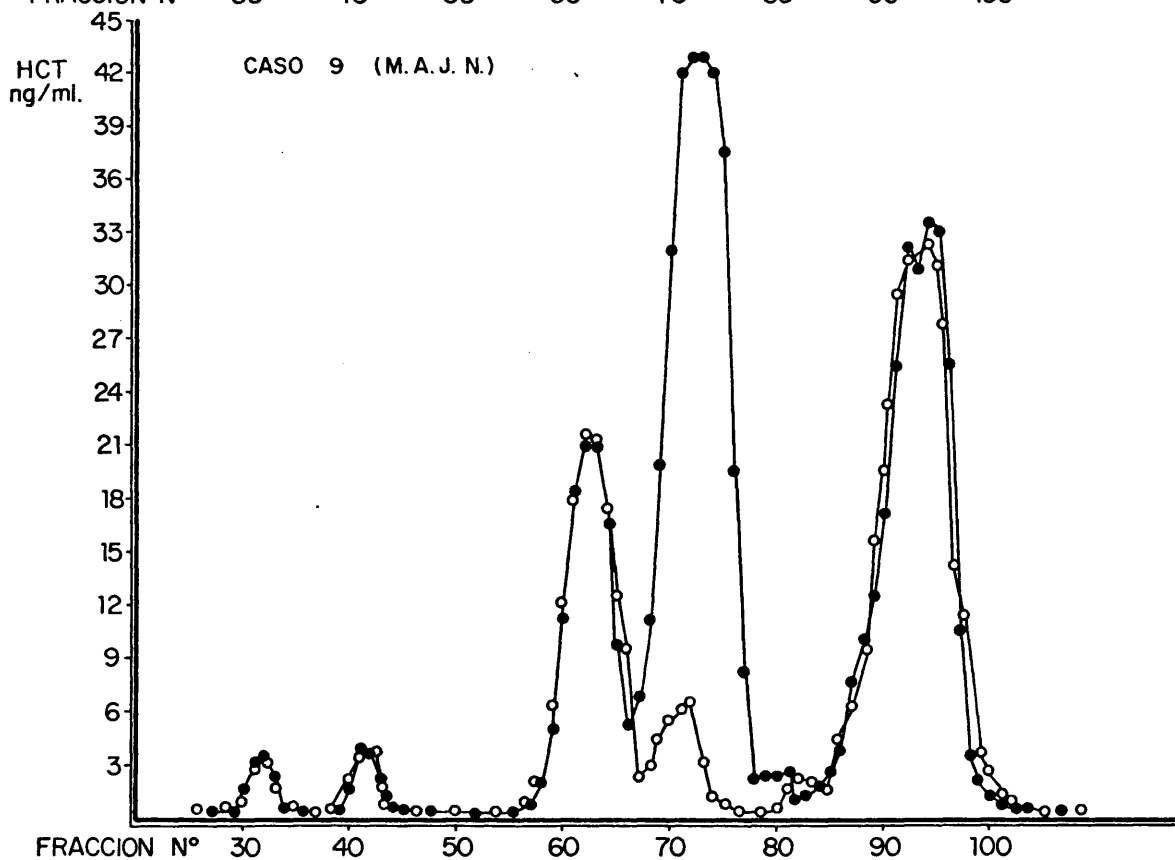
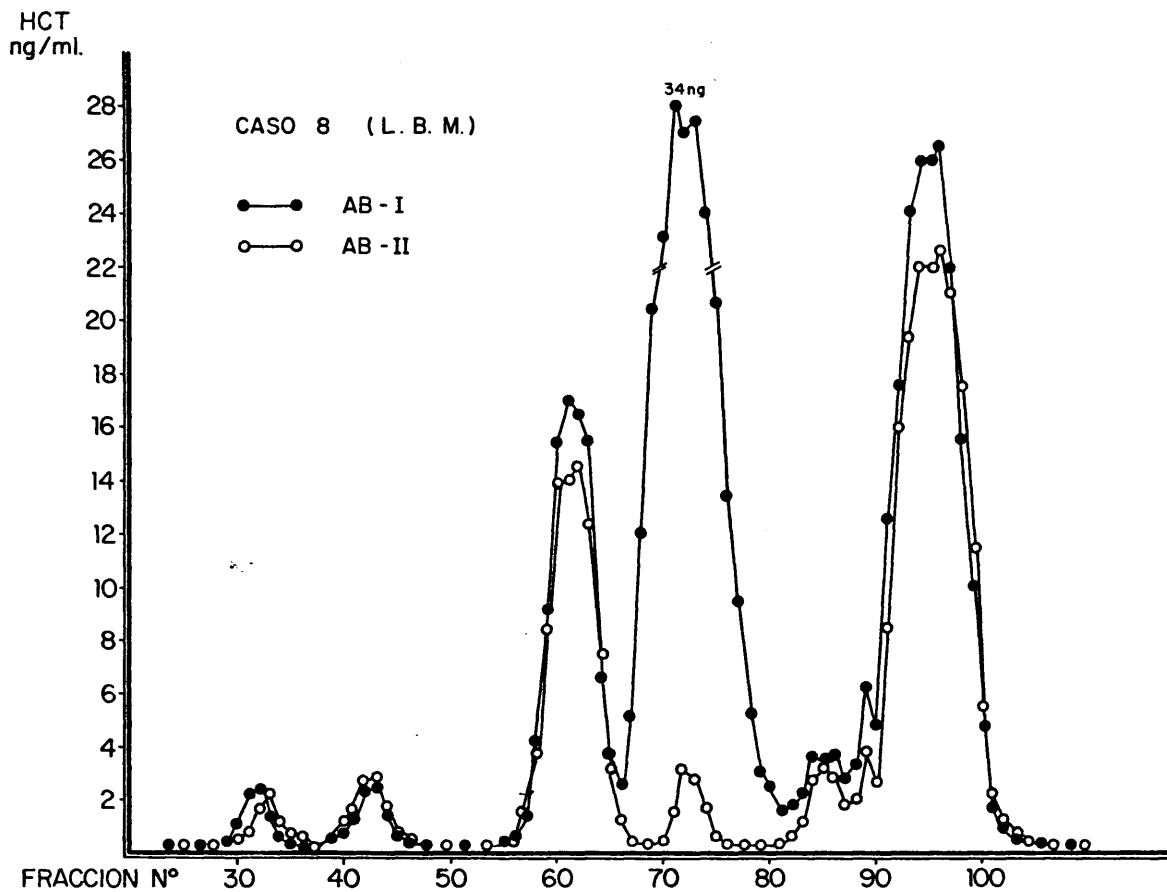


FIG. 29-1.- FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G.100 (COLUMNA 1.5 x 60 cm.)
DE SUEROS DE CMT, TRAS INFUSION DE CALCIO, TRATADOS CON
2 - ME 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO - UREA 8 M.
(FRACCIONES DE 1 ml.)

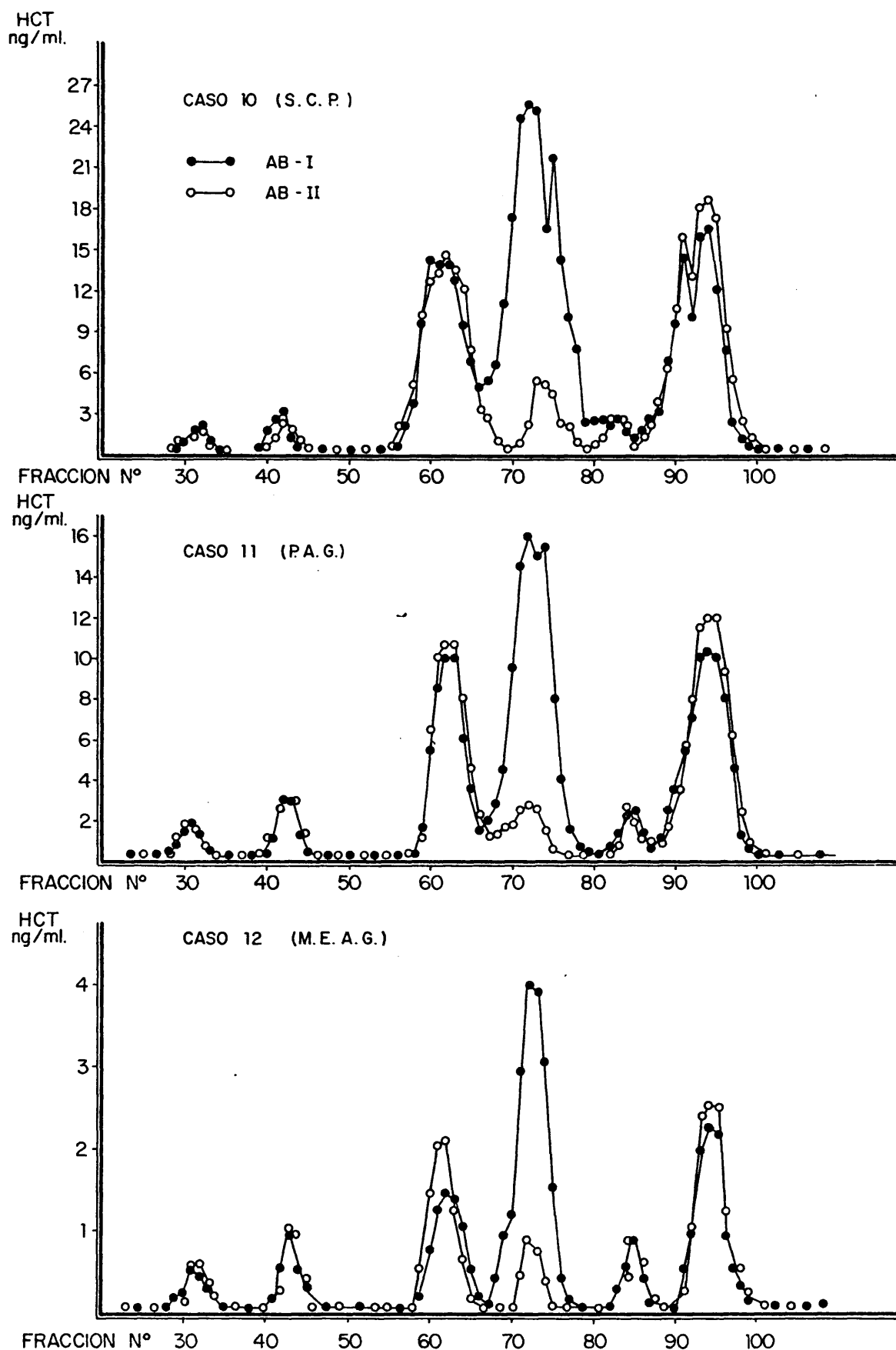


FIG. 29-2.- FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G.100 DE SUEROS DE CMT (TRAS INFUSION DE CALCIO), TRATADOS CON 2-ME 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO - UREA 8 M. (Continuación).

ESTIMULACION CON PENTAGASTRINA, TRATADOS CON 2-MERCAPTO-
ETANOL 3M.Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO-UREA 8M.
(Fracciones de 1 ml).

CASO 8,(L.B.M).

HCT: 1850 ng/ml (AB-I).

Se eluyó 1 ml de suero.

HCT: 802 ng/ml (AB-II).

Fracción nº	HCT ng7ml	Fracción nº	HCT ng7ml	Fracción nº	HCT ng7ml	Fracción nº	HCT ng7ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
28	0.25	38	1.10	28	0.36	38	0.69
29	1.80	39	2.90	29	3.42	39	1.75
30	5.00	40	5.20	30	7.18	40	3.90
31	6.50	41	6.60	31	8.29	41	7.00
32	7.00	42	8.00	32	6.15	42	11.00
33	7.00	43	7.50	33	3.82	43	11.00
34	4.70	44	8.00	34	1.88	44	10.50
35	2.05	45	5.50	35	0.80	45	6.73
36	1.62	46	2.40	36	0.20	46	1.30
37	0.77	47	0.41			47	0.43
pre-III		Pico III		pre-III		Pico III	
55	0.65	67	11.00	55	0.45	68	3.25
56	1.65	68	25.50	56	2.20	69	3.80
57	4.73	69	50.00	57	5.50	70	4.30
58	6.20	70	62.00	58	7.50	71	10.00
59	13.50	71	74.00	59	15.00	72	10.50
60	19.00	72	85.00	60	20.50	73	10.00
61	24.00	73	90.00	61	25.00	74	6.50
62	26.00	74	95.00	62	27.50	75	3.10
63	25.50	75	93.00	63	28.00	76	1.55
64	26.00	76	91.00	64	22.00	77	1.20
65	16.00	77	86.00	65	17.50	78	0.52
66	9.50	78	80.00	66	8.30		
Pico IV		79	64.00	67	3.00	Pico V	
85	22.50	80	55.00			89	4.50
86	14.50	81	64.00	Pico IV		90	15.50
Pico V		82	49.00	82	1.20	91	25.00
87	15.50	83	35.00	83	2.50	92	36.00
88	18.00	84	21.00	84	3.80	93	65.00
89	21.00			85	5.20	94	58.00
90	27.00	Pico I:		86	5.00	95	57.00
91	34.00	36.69 ng		87	4.50	96	52.00
92	37.50	(2.05%).		88	3.56	97	42.00
93	41.00	Pico II:		Pico I:32.1ng		98	30.00
94	44.00	47.61 ng.		(4.23%).		99	15.50
95	42.00	(2.66%).		Pico II:54.3ng		100	6.00
96	39.00	Pre-III:		(7.16%).		101	2.20
97	25.00	172.73 ng		Pre-III:		102	0.95
98	13.00	(9.65%).		182.45 ng		103	0.21
99	6.20	Pico III:		(24.06%).			
100	1.00	1130.5 ng.		Pico III: 53.72ng (7.08%).			
101	0.43	(63.16%).		Pico IV: 25.76 ng (3.40%).			
102	0.29	Pico IV:		Pico V: 409.86 ng (54.06%).			
103	0.24	37.23 ng					
		(2.08%).					

Pico V:365.16 ng (20.4%).

HCT eluida: 1850 ng.

HCT recuperada:1790ng(96.7%)

HCT eluida: 802 ng.

HCT recuperada:758.2ng(94.5%)

CASO 9, (M.A.J.N).

HCT: 1150 ng/ml (AB-I).
Se eluyó 1 ml de suero.

HCT: 471 ng/ml (AB-II).

Fracción n°	HCT ng/7ml	Fracción n°	HCT ng/7ml	Fracción n°	HCT ng/7ml	Fracción n°	HCT ng/7ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
28	0.18	39	0.74	28	0.22	39	0.36
29	1.00	40	1.05	29	0.80	40	0.95
30	4.35	41	4.40	30	5.10	41	3.56
31	4.16	42	4.69	31	4.80	42	4.25
32	4.00	43	4.95	32	2.55	43	4.22
33	2.05	44	2.57	33	1.80	44	3.06
34	1.26	45	1.00	34	0.43	45	0.95
35	0.43	46	0.30	35	0.20	46	0.25
Pre-III		Pico III		Pre-III		Pico III	
57	0.54	67	10.00	57	0.45	68	3.00
58	2.60	68	19.50	58	2.60	69	3.20
59	6.90	69	31.00	59	6.60	70	4.10
60	13.50	70	60.00	60	14.00	71	4.30
61	19.50	71	69.00	61	17.00	72	4.60
62	18.50	72	81.00	62	16.50	73	3.20
63	18.00	73	83.00	63	17.50	74	1.30
64	17.00	74	78.00	64	15.50	75	0.50
65	15.00	75	70.00	65	10.50		
66	8.50	76	59.00	66	7.50	Pico V	
Pico V		77	44.00	67	2.60	88	3.50
86	3.50	78	25.00			89	5.90
87	4.50	79	16.50	Pico IV		90	10.50
88	7.00	80	5.00	80	0.50	91	16.00
89	10.50	Pico IV		81	1.07	92	27.00
90	15.00	81	5.85	82	1.66	93	38.00
91	21.00	82	6.20	83	2.35	94	37.00
92	27.00	83	6.00	84	4.30	95	41.00
93	32.00	84	3.60	85	3.65	96	35.00
94	31.50	85	2.00	86	4.30	97	26.00
95	33.00			87	2.77	98	13.50
96	29.50					99	4.20
97	18.00					100	2.30
98	8.40					101	0.62
99	1.95					102	0.48
100	0.85						
101	0.66						
102	0.34						

Pico I: 17.43 ng (1.6%).
Pico II: 19.7 ng (1.8%).
Pre-III: 119.54 ng (11.11%).
Pico III: 651 ng (60.5%).
Pico IV: 23.65 ng (2.2%).
Pico V: 244.7 ng (22.74%).
HCT eluida: 1150 ng.
HCT recuperada (picos I a V):
1076 ng (95.56%).

Pico I: 15.9 ng (3.5%).
Pico II: 17.6 ng (3.9%).
Pre-III: 110.75 ng (24.6%).
Pico III: 24.3 ng (5.39%).
Pico IV: 20.6 ng (4.57%).
Pico V: 261 ng (57.98%).
HCT eluida: 471 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
450.15 ng (95.57%).

CASO 10, (S.C.P).

HCT: 880 ng/ml (AB-I).
Se eluyó 1 ml de suero.

HCT: 451 ng/ml (AB-II).

Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
28	0.45	40	0.50	28	0.43	40	0.36
29	2.62	41	1.29	29	2.10	41	1.30
30	2.95	42	1.98	30	2.30	42	2.42
31	2.66	43	2.12	31	2.60	43	2.30
32	2.26	44	1.93	32	1.56	44	1.85
33	1.16	45	0.68	33	0.55	45	0.83
34	0.40	46	0.20	34	0.30	46	0.24
Pre-III		Pico III		Pre-III		Pico III	
57	0.70	67	4.50	57	0.60	69	0.90
58	1.80	68	11.50	58	2.90	70	1.63
59	4.50	69	23.50	59	4.80	71	3.50
60	10.00	70	39.50	60	9.50	72	3.21
61	13.00	71	50.00	61	12.00	73	3.12
62	15.50	72	58.00	62	13.00	74	2.15
63	15.00	73	55.00	63	11.00	75	0.85
64	15.00	74	57.00	64	7.50	76	0.24
65	7.50	75	54.00	65	3.50	Pico V	
66	3.50	76	43.00	66	1.30	87	2.15
Pico V		77	21.00	67	1.20	88	4.90
87	2.20	78	11.50	68	0.50	89	11.50
88	4.50	79	5.20	Pico IV		90	18.50
89	11.50	80	1.60	82	0.48	91	25.00
90	20.50	81	0.55	83	1.96	92	31.00
91	24.50	Pico IV		84	2.64	93	39.00
92	30.00	82	0.77	85	2.20	94	42.00
93	34.00	83	1.32	86	1.76	95	43.00
94	39.00	84	1.82			96	40.00
95	38.00	85	2.06			97	29.00
96	36.00	86	1.98			98	13.50
97	27.00					99	6.20
98	17.50					100	2.00
99	6.00					101	0.97
100	2.40					102	0.43
101	0.94						
102	0.23						

Pico I: 12.5 ng(1.48%).
Pico II: 8.7 ng (1.03%).
Pre-III: 86.5 ng(10.22%).
Pico III: 435.85ng (51.53%).
Pico IV: 7.95 ng (0.93%).
Pico V: 294.27 ng (34.79%).
HCT eluida: 880 ng.
HCT recuperada(picos I-V):
845.77 ng (96.1%).

Pico I: 9,84 ng (2.27%).
Pico II: 9.3 ng (2.15%).
Pre-III: 79.3 ng(18.34%).
Pico III: 15,60 (3.61%).
Pico IV: 9,04 ng(2.09%).
Pico V: 309.15 ng(71.52%).
HCT eluida: 451 ng.
HCT recuperada (picos I-V)
432.23 ng (95.8%).

CASO 11, (P.A.G).

HCT: 320 ng/ml (AB-I).

HCT: 153 ng/ml (AB-II).

Se eluyeron 2 ml de suero.

Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
28	0.38	41	0.44	28	0.20	41	0.59
29	0.95	42	1.94	29	0.67	42	1.53
30	1.89	43	2.00	30	1.15	43	2.37
31	2.00	44	1.50	31	1.64	44	2.06
32	1.91	45	0.87	32	2.06	45	1.17
33	0.86	46	0.20	33	1.30	46	0.26
34	0.21	Pico III		34	0.58	Pico III	
Pre-III		66	5.65	Pre-III		68	0.80
57	0.66	67	9.50	57	0.50	69	1.95
58	1.59	68	18.00	58	1.40	70	4.00
59	4.25	69	25.00	59	5.25	71	4.00
60	7.50	70	34.50	60	8.00	72	4.50
61	10.00	71	33.50	61	11.50	73	3.90
62	11.00	72	36.00	62	12.00	74	2.20
63	10.50	73	36.50	63	11.50	75	1.00
64	6.50	74	34.00	64	6.00	76	0.25
65	4.60	75	31.50	65	3.10	Pico V	
Pico V		76	24.00	66	1.55	86	3.25
86	2.90	77	18.00	67	0.45	87	5.00
87	4.50	78	13.00	Pico IV		88	7.50
88	8.00	79	6.20	83	0.46	89	11.50
89	12.50	80	3.10	84	2.62	90	15.50
90	16.00	81	1.20	85	2.55	91	12.50
91	13.00	82	0.50			92	22.00
92	21.00	Pico IV				93	21.00
93	23.00	83	0.85			94	24.00
94	25.00	84	2.40			95	22.50
95	24.00	85	1.65			96	18.50
96	19.00					97	11.50
97	10.50					98	7.50
98	6.10					99	2.20
99	2.90					100	1.15
100	1.00					101	0.35
101	0.45					102	0.25
102	0.15						

Pico I: 8.2 ng (1.37%).
Pico II: 6.95 ng (1.16%).
Pre-III: 56.6 ng (9.48%).
Pico III: 330.15 ng (55.32%).
Pico IV: 4.90 ng (0.82%).
Pico V: 190 ng (31.83%).
HCT eluida: 640 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
596.8 ng (93.25%).

Pico I: 7.6 ng (2.6%).
Pico II: 7.98 ng (2.74%).
Pre-III: 61.25 ng (21.03%).
Pico III: 22.6 ng (7.76%).
Pico IV: 5.63 ng (1.93%).
Pico V: 186.2 ng (63.93%).
HCT eluida: 306 ng.
HCT recuperada (picos I-V)
291.26 ng (95.18%).

TABLA 9d, (continuación). FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100
DE SUEROS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS, TRAS ESTIMU-
LACION CON PENTAGASTRINA, TRATADOS CON 2-MERCAPTOETANOL 3M
Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO-UREA 8M.

CASO 12, (M.E.A.G).

HCT: 66 ng/ml (AB-I).

HCT: 42.6 ng/ml (AB-II).

Se eluyeron 2 ml de suero.

<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
30	0.20	41	0.33	30	0.35	41	0.48
31	0.73	42	0.89	31	0.86	42	1.31
32	1.09	43	1.04	32	1.13	43	1.32
33	0.72	44	0.95	33	0.97	44	1.16
34	0.19	45	0.45	34	0.29	45	0.58
Pre-III		Pico III		Pre-III		Pico III	
59	0.37	67	1.20	59	0.42	70	0.53
60	0.92	68	2.60	60	1.69	71	1.76
61	1.95	69	4.00	61	2.94	72	2.05
62	4.00	70	3.30	62	3.70	73	1.98
63	3.50	71	8.50	63	3.55	74	1.22
64	2.60	72	10.50	64	2.60	75	0.36
65	1.39	73	10.50	65	1.93		
66	1.00	74	9.00	66	0.63	Pico V	
		75	6.20	67	0.40	87	0.55
Pico V		76	2.10	Pico IV		88	0.94
87	0.62	77	0.95	81	0.40	89	1.35
88	0.95	78	0.50	82	1.80	90	2.66
89	1.85	79	0.20	83	2.68	91	2.00
90	2.55			84	2.52	92	3.35
91	2.15	Pico IV		85	1.59	93	6.50
92	5.60	81	0.47	86	0.41	94	6.00
93	6.70	82	1.57			95	7.50
94	6.50	83	3.02			96	4.90
95	4.80	84	3.15			97	1.75
96	3.75	85	1.40			98	0.89
97	1.92	86	0.49			99	0.53
98	1.00					100	0.23
99	0.54						
100	0.22						

Pico I: 2.93 ng (2.29%).
Pico II: 3.66 ng (2.86%).
Pre-III: 15.73 ng (12.38%).
Pico III: 59.55 ng (46.67%).
Pico IV: 10.1 ng (7.91%).
Pico V: 35.62 ng (27.91%).

HCT eluida: 132 ng.

HCT recuperada (picos I-V):
127.59 ng (96.66%).

Pico I: 3.6 ng (4.35%).
Pico II: 4.85 ng (5.86%).
Pre-III: 17.86 ng (21.58%).
Pico III: 7.9 ng (9.54%).
Pico IV: 9.4 ng (11.35%).
Pico V: 39.15 ng (47.3%).

HCT eluida: 85.2 ng.

HCT recuperada (picos I-V):
82.76 ng (97.13%).

DE SUEROS DE CARCINOMAS MEDULARES TIROIDEOS, TRAS ESTIMULACION CON PENTAGASTRINA, TRATADOS CON 2-MERCAPTOETANOL 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO-UREA 8M.

CASO 13, (C.S.N).

HCT: 1045 ng/ml, (AB-I).

HCT: 500 ng/ml (AB-II).

Se eluyó 1 ml de suero.

Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
30	0.40	39	0.38	30	0.26	39	0.36
31	1.96	40	0.93	31	1.32	40	1.19
32	2.39	41	2.68	32	2.50	41	2.80
33	1.95	42	2.61	33	2.40	42	3.05
34	1.28	43	1.31	34	0.80	43	3.16
35	0.62	44	0.97	35	0.17	44	1.23
Pre-III		45	0.27	Pre-III		45	0.39
55	0.53	Pico III		55	0.49	Pico III	
56	1.52	67	11.00	56	2.33	70	1.15
57	4.40	68	20.00	57	6.00	71	3.60
58	4.35	69	31.00	58	5.75	72	4.10
59	10.50	70	45.00	59	10.50	73	4.60
60	12.50	71	56.00	60	13.00	74	3.20
61	15.50	72	60.00	61	13.50	75	1.20
62	15.50	73	58.00	62	16.00	76	0.95
63	16.00	74	56.00	63	15.50	77	0.50
64	14.50	75	44.00	64	14.00	78	0.24
65	13.00	76	35.00	65	10.50	Pico V	
66	8.10	77	35.00	66	6.20	86	3.40
Pico V		78	29.00	67	3.70	87	4.20
87	2.95	79	19.00	68	2.20	88	5.00
88	5.25	80	9.00	69	0.73	89	10.50
89	8.50	81	2.60	Pico IV		90	10.50
90	12.50	82	2.20	81	0.38	91	16.50
91	17.50	Pico IV		82	1.63	92	26.00
92	23.50	83	2.45	83	2.49	93	26.00
93	30.50	84	3.15	84	3.90	94	42.00
94	40.50	85	2.65	85	3.00	95	39.00
95	41.00	86	2.35			96	40.00
96	39.00					97	34.00
97	40.00					98	23.00
98	26.00					99	14.00
99	17.00					100	7.50
100	10.50					101	3.00
101	6.20					102	1.00
102	1.90					103	0.30
103	0.75						

Pico I: 8.6 ng (0.87%).
Pico II: 10.15 ng (1.03%).
Pre-III: 116.4 ng (11.85%).
Pico III: 512.8 ng (52.21%).
Pico IV: 10.6 ng (1.08%).
Pico V: 323.55 ng (32.94%).
HCT eluida: 1045 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
982.1 ng (93.98%).

Pico I: 7.45 ng (1.56%).
Pico II: 12.18 ng (2.55%).
Pre-III: 120.4 ng (25.24%).
Pico III: 19.6 ng (4.11%).
Pico IV: 11.4 ng (2.39%).
Pico V: 305.9 ng (64.14%).
HCT eluida: 500 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
476.93 ng (95.38%).

CASO 14, (P.G.R.).

HCT: 175 ng/ml (AB-I).

HCT: 103 ng/ml (AB-II).

Se eluyeron 2 ml de suero.

Fracción n°	HCT ng/ml	Fracción n°	HCT ng/ml	Fracción n°	HCT ng/ml	Fracción n°	HCT ng/ml
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
30	0.35	41	0.47	30	0.39	41	0.32
31	1.31	42	1.15	31	1.62	42	0.91
32	1.17	43	1.36	32	2.05	43	1.35
33	1.18	44	1.46	33	1.64	44	1.12
34	0.29	45	0.69	34	0.40	45	0.60
Pre-III		46	0.30	Pre-III		46	0.20
58	0.39	Pico III		58	0.45	Pico III	
59	0.96	67	4.25	59	1.15	70	1.18
60	1.50	68	6.00	60	1.85	71	3.60
61	5.50	69	12.00	61	4.70	72	3.20
62	8.50	70	16.50	62	8.50	73	3.50
63	7.00	71	18.50	63	7.50	74	1.88
64	7.50	72	22.00	64	7.50	75	0.39
65	4.20	73	20.00	65	5.00		
66	3.35	74	21.00	66	2.20	Pico V	
Pico V		75	18.50	67	1.00	87	1.25
87	1.40	76	11.00	68	0.50	88	2.25
88	2.10	77	8.50	69	0.25	89	4.10
89	3.25	78	6.40	Pico IV		90	6.50
90	5.50	79	3.25	82	0.45	91	9.50
91	10.00	80	1.80	83	0.90	92	16.50
92	15.50	81	0.30	84	1.20	93	18.00
93	16.00	Pico IV		85	1.65	94	18.50
94	17.50	83	0.66	86	0.90	95	14.00
95	12.00	84	1.16			96	15.00
96	13.50	85	1.21			97	11.00
97	9.50	86	0.92			98	4.30
98	4.30					99	1.94
99	1.95					100	0.95
100	0.86					101	0.46
101	0.41						

Pico I: 4.3 ng (1.27%).
Pico II: 5.43 ng (1.61%).
Pre-III: 38.9 ng (11.56%).
Pico III: 170 ng (50.54%).
Pico IV: 3.95 ng (1.17%).
Pico V: 113.77 ng (33.82%).
HCT teóricamente eluida:
350 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
336.35 ng (96.1%).

Pico I: 6.1 ng (3.14%).
Pico II: 4.5 ng (2.31%).
Pre-III: 40.6 ng (20.89%).
Pico III: 13.75 ng (7.07%).
Pico IV: 5.1 ng (2.62%).
Pico V: 124.25 ng (63.94%).
HCT teóricamente eluida:
206 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
194.3 ng (94.32%).

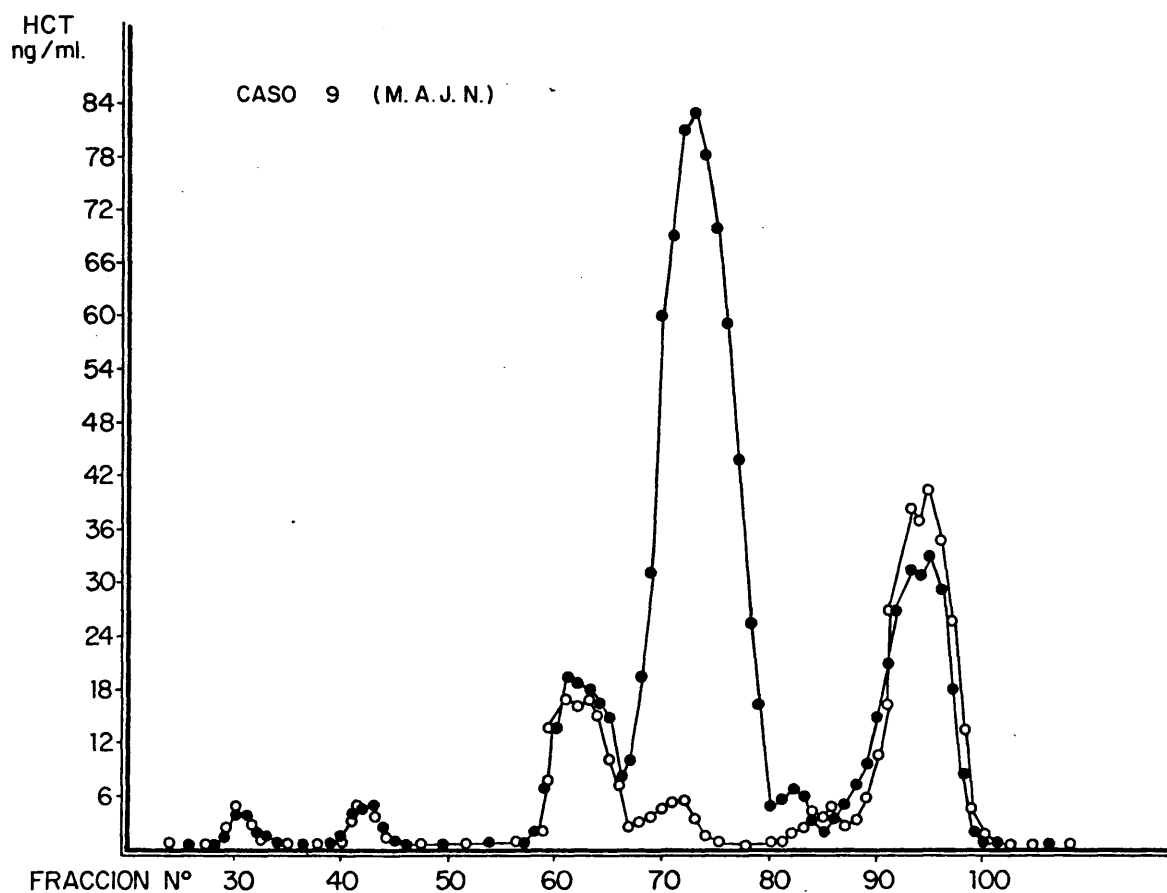
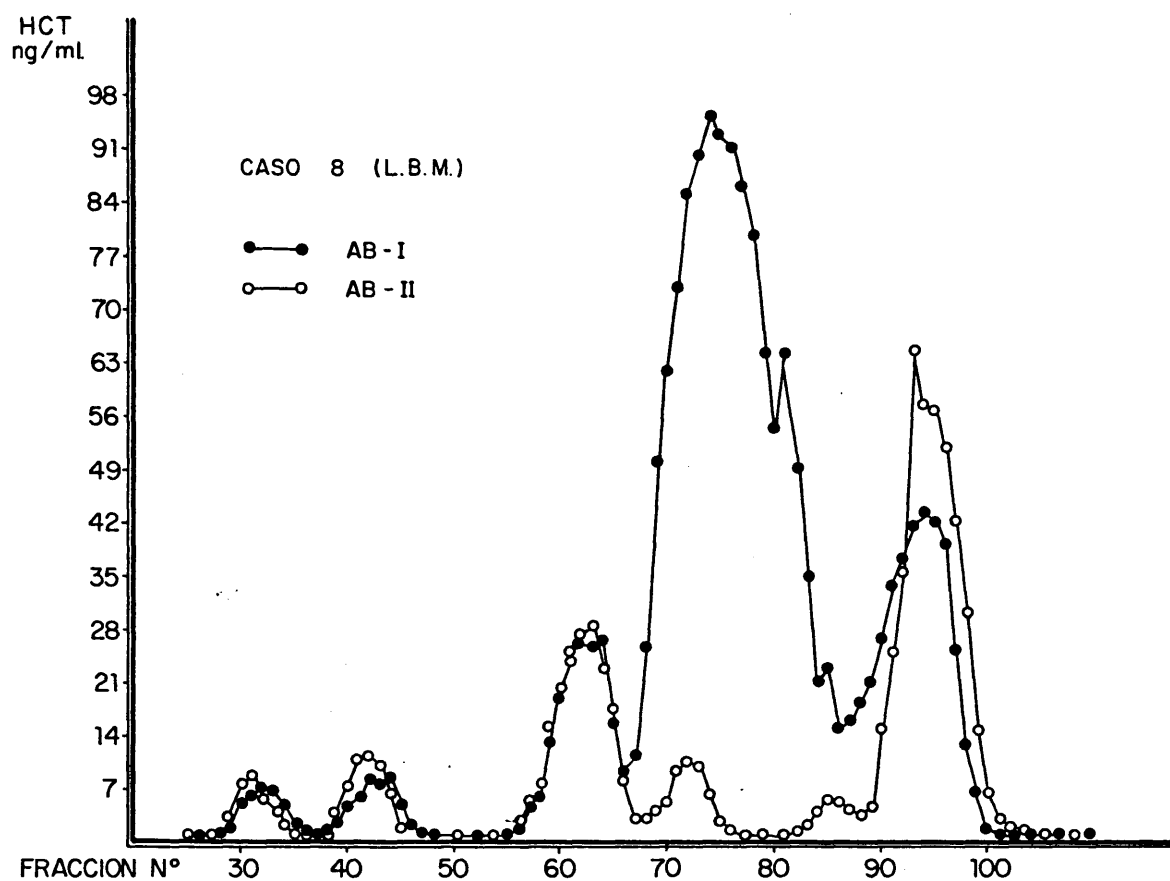


FIG. 30 - 1.- FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G. 100 (COLUMNA 1.5 x 60 cm.) DE SUEROS DE CMT (TRAS ESTIMULACION CON PENTAGASTRINA), TRATADOS CON 2-ME 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO - UREA 8 M. (FRACCIONES DE 1 ml.).

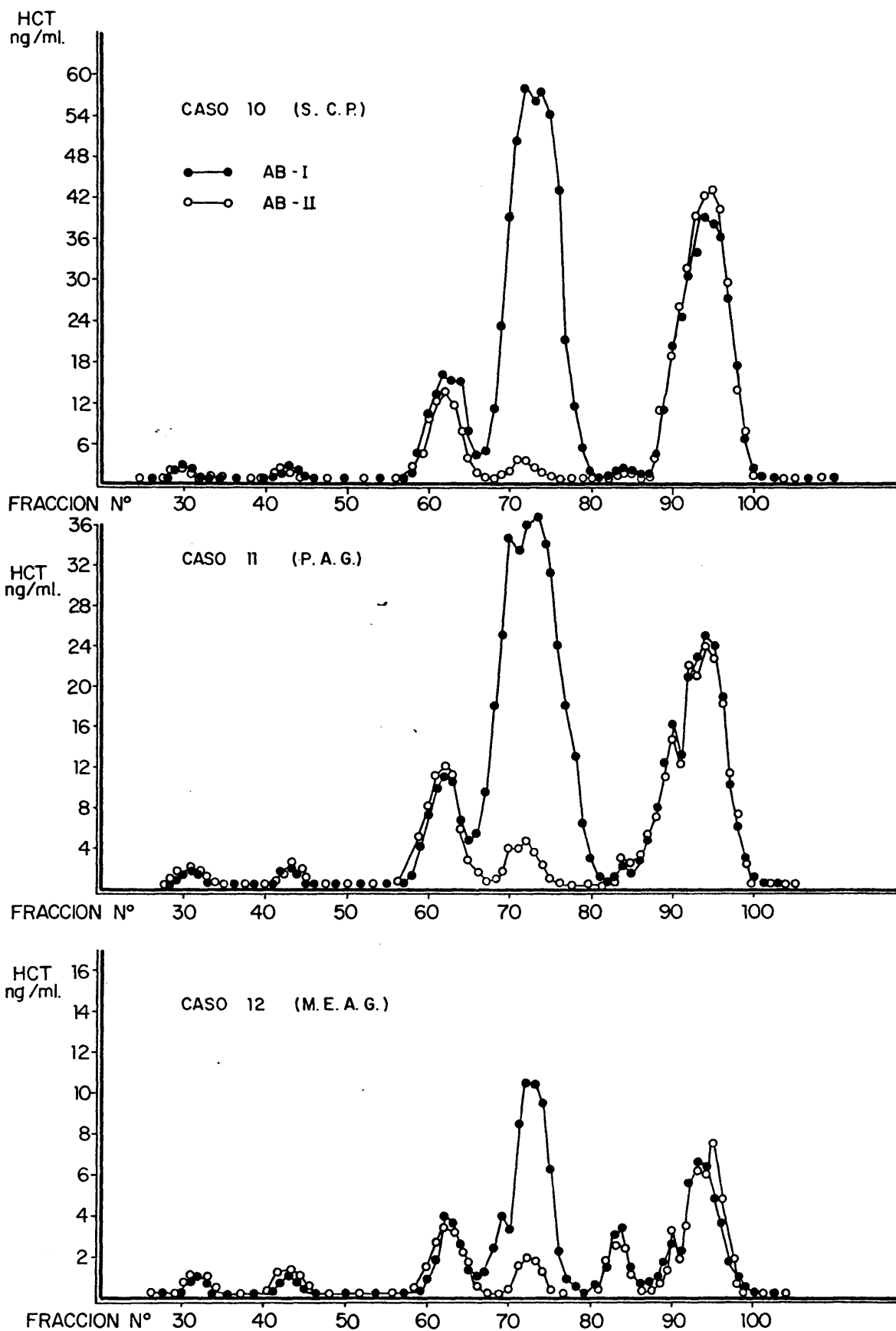


FIG. 30-2.- FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G.100 DE SUEROS DE CMT (TRAS ESTIMULACION CON PENTAGASTRINA) TRATADOS CON 2-ME 3M Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO-UREA 8M. (Continuación)

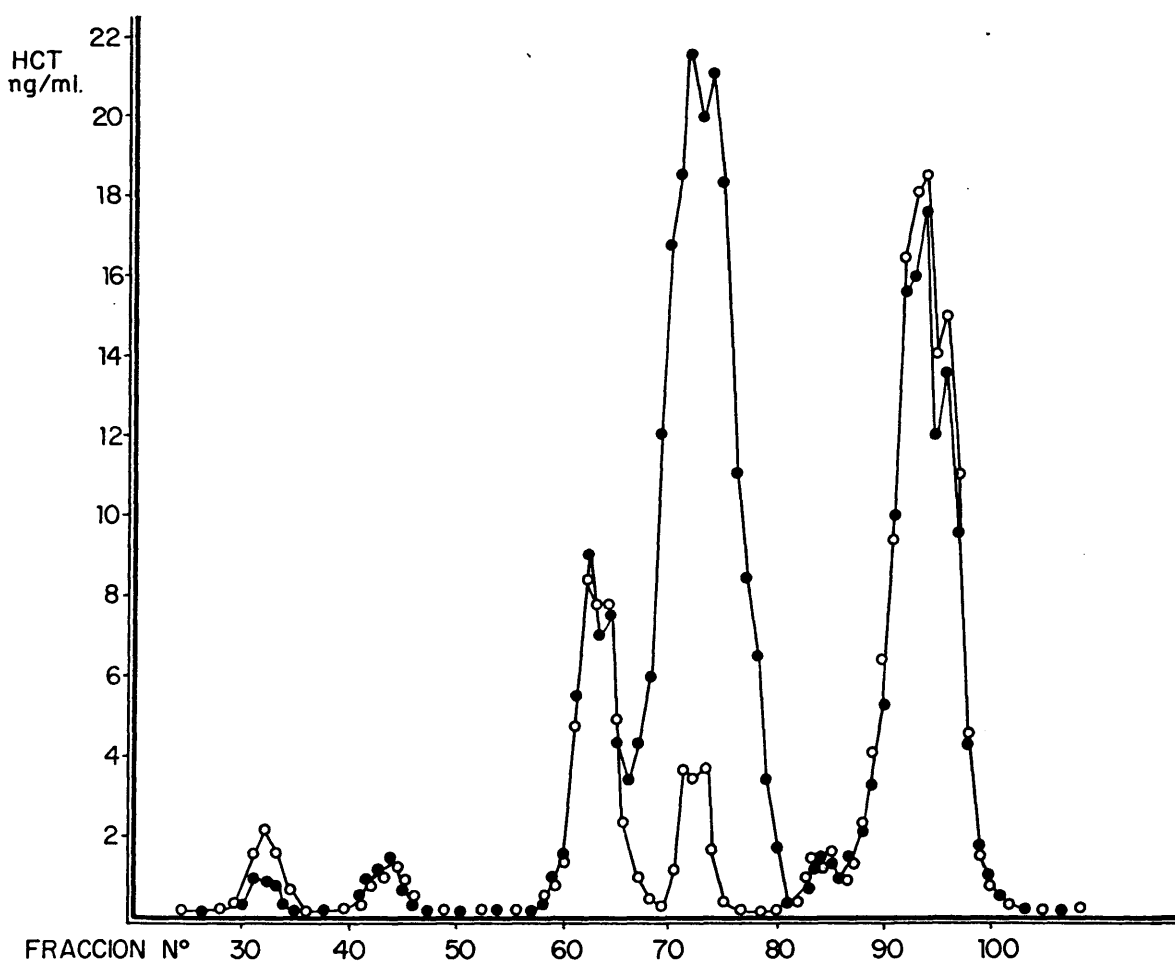
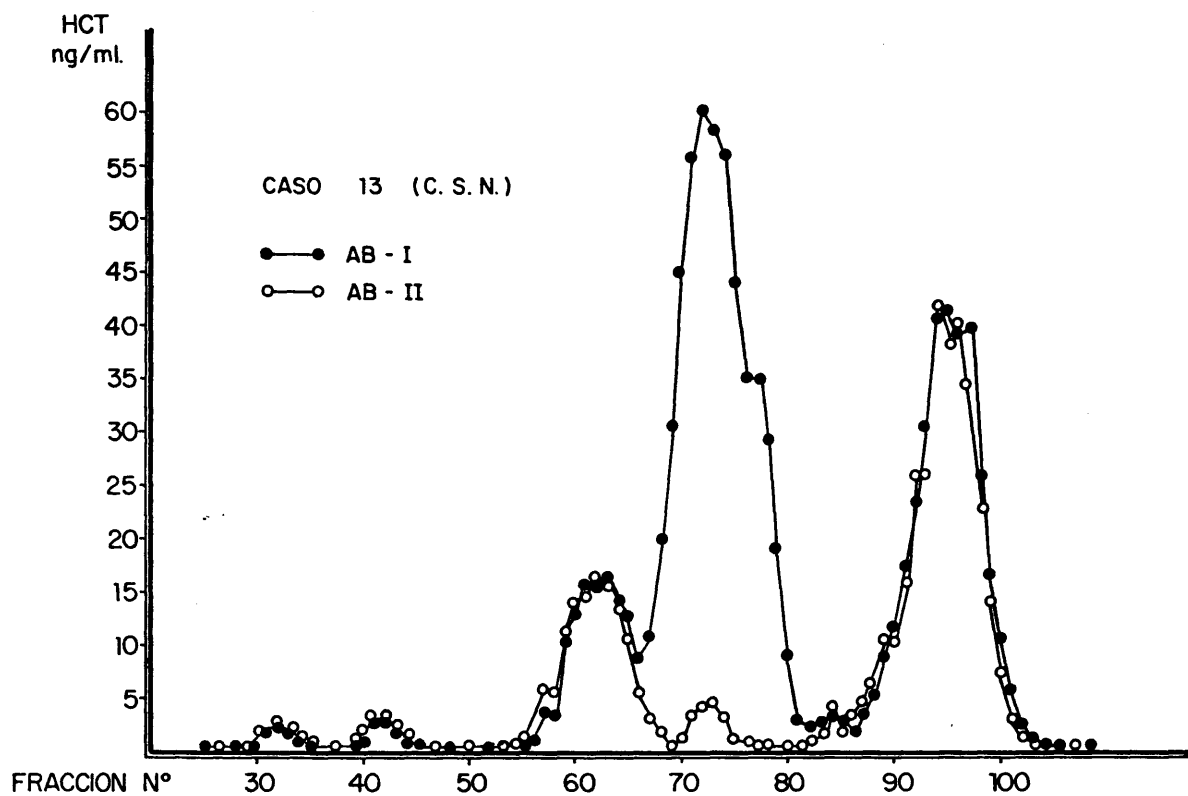


FIG. 30-3.- FRACIONAMIENTOS EN SEPHADEX G.100 DE SUEROS DE CMT
(TRAS ESTIMULACION CON PENTAGASTRINA) TRATADOS CON
2- ME 3 M Y ELUIDOS CON UN BUFFER FOSFATO - UREA 8 M.
(Continuación)

IV.4-4. MIELOMAS.

N=10. \bar{X} edad: 70.7 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%).		HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	125	9.9	3.9	6)	360	7.8	3.7
2)	Tr.	8.6	4.6	7)	2100	12.7	4.7
3)	390	8.1	3.8	8)	415	9.3	4.2
4)	450	10.7	5.2	9)	190	8.2	5.0
5)	510	7.2	4.9	10)	280	10.5	4.0

HCT indetectable: 1 caso (nº2).

HCT significativamente elevada ($p < 0.001$): caso nº7.

No se realizó prueba de estimulación con pentagastrina al existir una gran osteolisis con hipercalcemia y severa afectación del estado general del paciente.

Correlación HCT:Ca, (r)=0.664. ($p < 0.025$).

Correlación HCT:P, (r)=0.212.(No significativa).

Correlación HCT:Ca/P,(r)=0.431.(No significativa).

IV.4-5. NEOPLASIAS HEPATICAS.

N=10. \bar{X} edad=64.0 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)		HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	245	9.1	4.3	6)	190	7.9	3.9
2)	510	8.3	4.0	7)	280	8.2	5.1
3)	9.600	8.8	3.9	8)	205	8.0	3.8
4)	130	9.1	4.4	9)	330	9.0	4.2
5)	190	8.8	4.9	10)	490	8.7	3.9

HCT indetectable: 0 casos.

r HCT:Ca= 0.160; r HCT:P=-0.279; r HCT:Ca/P=0.389.

El caso número 3 mostró en otra determinación posterior unos niveles basales de HCT (8.500 pg/ml) también significativamente elevados. Los resultados del fraccionamiento en Sephadex del suero de este paciente se recogen en las tablas 10-a y 10-b, y en las figuras 31-a y 31-b.

TABLA 10-a. FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100
(columna 1.5x60 cm) DE UNA ALICUOTA DE SUERO DE UN
PACIENTE CON UN HEPATOCARCINOMA DIFUSO.(Fracciones de 1ml)

CASO 3,(Varón de 65 años de edad. A.M.G).

HCT basal: 9.6 ng/ml (AB-I) ; 8.7 ng/ml (AB-II).

Se eluyeron 3 ml de suero.

<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>
------------------------------	----------------------------	------------------------------	----------------------------	------------------------------	----------------------------	------------------------------	----------------------------

Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
32	0.165	43	0.15	32	0.215	43	0.125
33	0.300	44	0.50	33	0.320	44	0.650
34	0.240	45	0.23	34	0.230	45	0.350
35	0.130	46	0.40	35	0.290	46	0.270
		47	0.13			47	0.240
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
69	0.200	82	0.160	71	0.195	82	0.240
70	0.650	83	0.530	72	0.360	83	0.530
71	0.320	84	1.320	73	0.150	84	1.950
72	0.800	85	1.500	74	0.390	85	1.640
73	1.150	86	1.100	75	0.180	86	1.500
74	0.510	87	0.855			87	0.600
75	0.200						
Pico V				Pico V			
88	0.940 ng/ml			88	0.760 ng/ml		
89	1.150			89	0.950		
90	0.950			90	1.150		
91	1.590			91	1.750		
92	2.200			92	2.050		
93	2.050			93	2.250		
94	2.700			94	2.650		
95	1.000			95	1.150		
96	1.200			96	0.600		
97	0.550			97	0.520		
98	0.275			98	0.230		

Pico I: 0.835 ng (3.2%).
Pico II: 1.410 ng (5.4%).
Pico III: 3.83 ng (14.65%).
Pico IV: 5.465 ng (20.90%).
Pico V: 14.605 ng (55.85%).

HCT teóricamente eluida:
28.8 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
26.15 ng (90.8%).

Pico I: 1.055 ng (4.4%).
Pico II: 1.635 ng (6.8%).
Pico III: 1.275 ng (5.3%).
Pico IV: 6.060 ng (25.2%).
Pico V: 14.015 ng (58.3%).

HCT teóricamente eluida:
26.1 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
24.04 ng (92.1%).

TABLA 10-b. FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100 DE UNA ALICUOTA DE SÜERO,TRATADA CON 2-MERCAPTOETANOL 3M,DE UN PACIENTE CON UN HEPATOCARCINOMA DIFUSO, ELUIDA CON UN BUFFER FOSFATO-UREA 8M.(Paciente: A.M.G).

HCT basal: 9.6 ng/ml (AB-I); HCT basal:8.7 ng/ml (AB-II)
Se eluyeron 3 ml de suero.

<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HCT</u> <u>ng/ml</u>	<u>Fracción</u> <u>nº</u>	<u>HC</u> <u>ng</u>
Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
32	0.230	42	0.145	32	0.260	42	0.160
33	0.350	43	0.560	33	0.290	43	0.480
34	0.215	44	0.330	34	0.220	44	0.355
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
69	0.320	84	0.210	71	0.340	85	0.390
70	0.560	85	0.255	72	0.420	86	0.270
71	1.250	86	0.140	73	0.295		
72	1.460						
73	0.635						
74	0.220						
Pico V				Pico V			
89	0.340 ng/ml			89	0.220 ng/ml		
90	0.520			90	0.430		
91	0.420			91	0.350		
92	1.350			92	0.980		
93	2.620			93	2.800		
94	3.500			94	4.100		
95	3.100			95	3.450		
96	2.600			96	3.500		
97	1.950			97	1.580		
98	2.100			98	1.950		
99	0.910			99	1.250		
100	0.400			100	0.315		
101	0.240			101	0.130		

Pico I: 0.795 ng (2.95%).
Pico II: 1.035 ng (3.84%).
Pico III: 4.445 ng (16.5%).
Pico IV: 0.605 ng (2.25%).
Pico V: 20.05 ng (74.46%).

Pico I:0.77 ng (3.14%).
Pico II:0.995 ng (4.05%).
Pico III:1.055 ng (4.3%).
Pico IV: 0.66 ng (2.7%).
Pico V: 21.055 ng (85.81%).

HCT teóricamente eluida:
28.8 ng.

HCT teóricamente eluida:
26.1 ng.

HCT recuperada (picos I-V):
26.93 ng (93.5%).

HCT recuperada (picos I-V):
24.535 ng (94.0%).

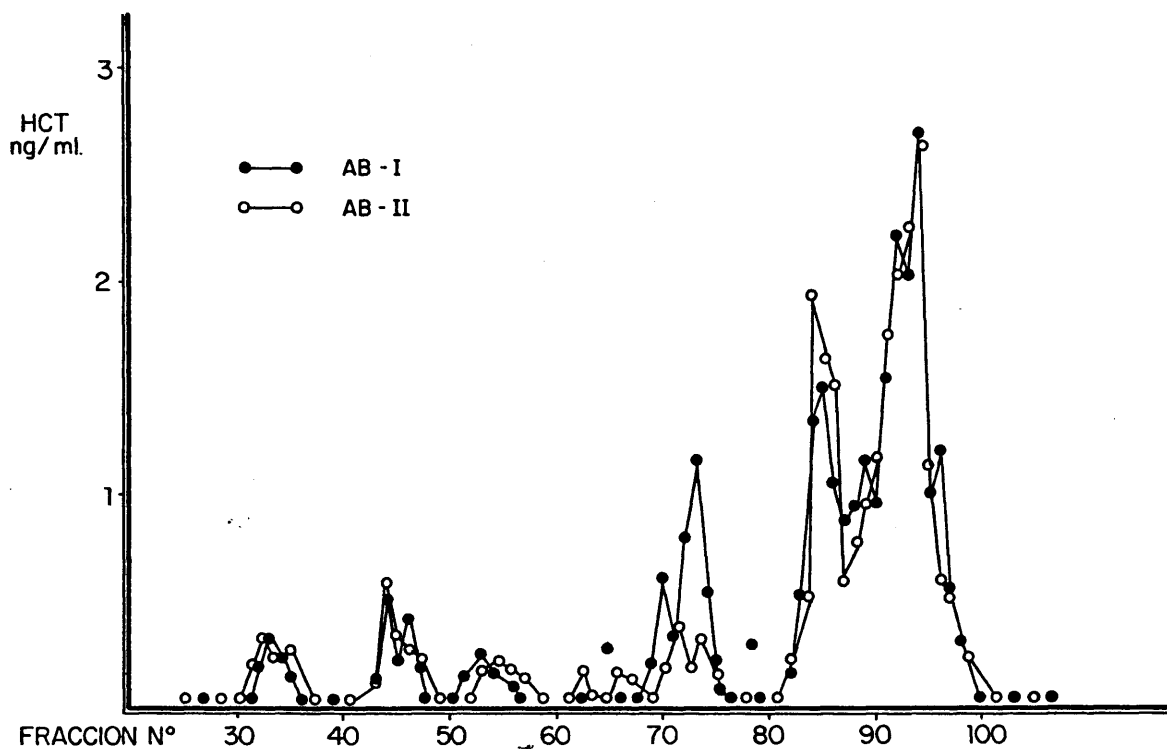


FIG. 31 a - FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G.100 DE UN SUERO DE HEPATOCARCINOMA (BASAL)

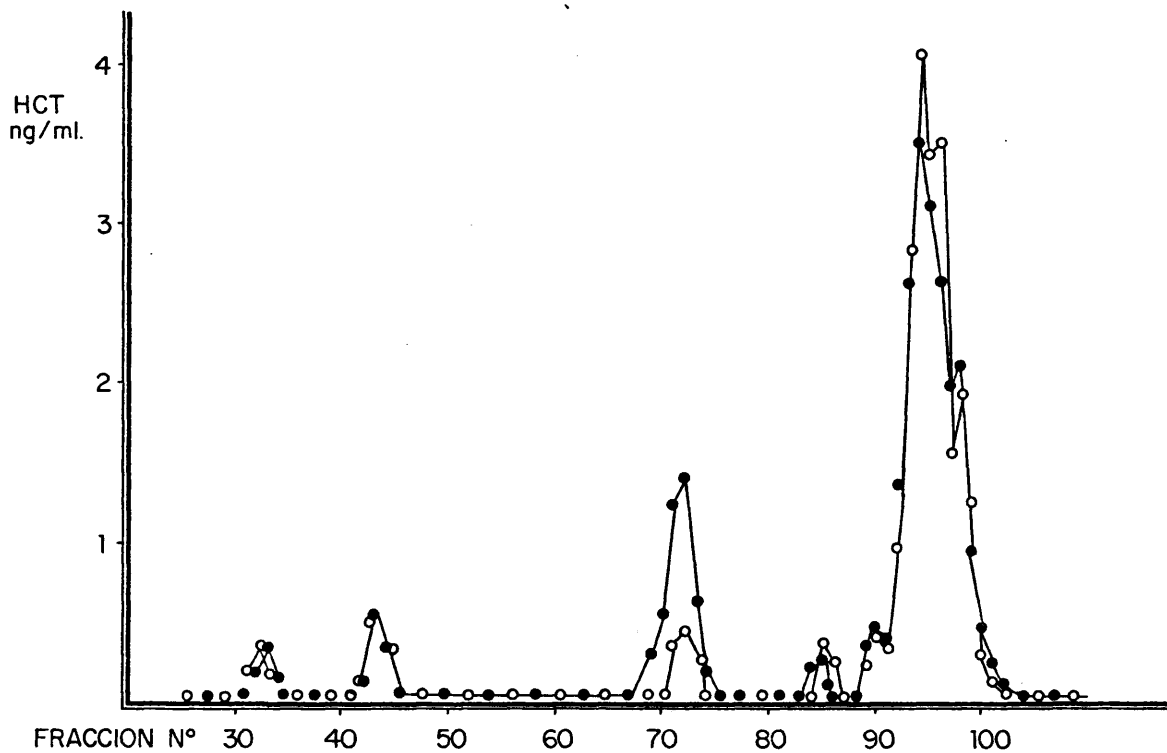


FIG. 31 b - FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G.100 DE SUERO DE HEPATOCARCINOMA TRATADO CON 2-ME 3M Y ELUIDO CON UN BUFFER FOSFATO-UREA 8M.

IV.4-6. NEOPLASIAS DE PROSTATA.

N= 6. \bar{X} edad: 72.7 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)		HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	130	9.1	4.1	4)	480	7.9	5.1
2)	Tr.	8.4	4.0	5)	325	8.3	4.9
3)	420	8.8	3.9	6)	Tr.	6.1	4.8

HCT indetectable: 2 casos (33.3%).

r HCT:Ca= 0.349; r HCT:P=0.287; r HCT:Ca/P= 0.057.

IV.4-7. NEOPLASIAS DE RIÑON.

N= 6. \bar{X} edad: 58 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)		HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	405	8.3	4.2	4)	360	7.9	3.5
2)	1.410	13.0	4.1	5)	12.300	8.2	4.0
3)	290	7.8	4.3	6)	130	8.2	4.7

HCT indetectable: 0 casos.

r HCT:Ca= -0.078; r HCT:P= -0.185; r HCT:Ca/P=-0.017.

El caso n°5 correspondía a una mujer (V.F.M) de 65 años de edad con un hipernefroma sin metástasis óseas. En otra determinación posterior mostró unos niveles basales de HCT de 14.500 pg/ml; ($p < 0.0001$).

El caso n°2 correspondía un varón (A.S.M) de 48 años con un hipernefroma que había dado metástasis en fémur y columna lumbar. (1410 pg/ml, $p < 0.005$).

El resultado del fraccionamiento en Sephadex del suero del caso n°5 se recoge en las tablas 11-a y 11-b, y graficamente en las figuras. 33-a y 33-b.

TABLA 11-a. FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100
DE UNA ALICUOTA DE SUERO DE UN PACIENTE CON UN
HIPERNEFROMA SIN METASTASIS OSEAS.

Paciente: mujer (V.F.M) de 65 años de edad.

HCT basal: 12.3 ng/ml (AB-I). HCT basal: 10.9 ng/ml (AB-II)

Se eluyeron 3 ml de suero.

<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>	<u>Fracción</u>	<u>HCT</u>
<u>nº</u>	<u>ng/ml</u>	<u>nº</u>	<u>ng/ml</u>	<u>nº</u>	<u>ng/ml</u>	<u>nº</u>	<u>ng/ml</u>

Pico I		Pico II	
33	0.215	41	0.135
34	0.160	42	0.360
35	0.280	43	0.320
		44	0.270

Pico III		Pico IV	
68	0.150	80	0.225
69	0.290	81	0.360
70	0.690	82	0.780
71	1.190	83	1.190
72	1.320	84	1.310
73	1.230	85	1.250
74	0.970	86	0.810
75	0.680	87	0.500
76	0.360		

Pico V	
88	0.610 ng/ml
89	0.860
90	1.150
91	1.460
92	2.500
93	2.300
94	3.150
95	2.800
96	1.940
97	0.960
98	0.320
99	0.270

Pico I: 0.655 ng (1.96%).
Pico II: 1.085 ng (3.25%).
Pico III: 6.88 ng (20.6%).
Pico IV: 6.465 ng (19.35%).
Pico V: 18.32 ng (54.84%).

HCT teóricamente eluida: 36.9 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
33.405 ng (90.5%).

Pico I		Pico II	
33	0.175	41	0.12
34	0.290	42	0.23
35	0.210	43	0.24
		44	0.25

Pico III		Pico IV	
71	0.195	80	0.20
72	0.360	81	0.41
73	0.240	82	0.59
74	0.130	83	1.10
		84	1.25
		85	1.16
		86	0.92
		87	0.66

Pico V	
88	0.730 ng/ml
89	0.800
90	1.300
91	1.250
92	2.740
93	2.750
94	3.500
95	3.300
96	2.050
97	1.150
98	0.690
99	0.330

Pico I: 0.675 ng (2.3%).
Pico II: 0.840 ng (2.86%).
Pico III: 0.925 ng (3.15%).
Pico IV: 6.29 ng (21.45%).
Pico V: 20.6 ng (70.24%).

HCT teóricamente eluida: 32.7 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
29.325 ng (89.67%).

TABLA 11-b. FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100 DE UNA
ALICUOTA DE SUERO DE UN PACIENTE CON UN HIPERNEFROMA
SIN METASTASIS OSEAS:

Paciente: mujer (V.F.M) de 65 años de edad.

HCT basal:12.3 ng/ml (AB-I). HCT basal:10.9 ng/ml (AB-II).

Se eluyeron 3 ml de suero.

Fracción n°	HCT ng/ml	Fracción n°	HCT ng/ml	Fracción n°	HCT ng/ml	Fracción n°	HCT ng/ml
----------------	--------------	----------------	--------------	----------------	--------------	----------------	--------------

Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
34	0.26	42	0.19	34	0.165	43	0.235
35	0.34	43	0.32	35	0.290	44	0.290
36	0.21	44	0.29	36	0.160	45	0.130
		45	0.23				
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
69	0.17	83	0.24	71	0.195	83	0.095
70	0.34	84	0.24	72	0.320	84	0.170
71	0.96	85	0.32	73	0.160	85	0.320
72	1.29	86	0.29	74	0.190	86	0.230
73	1.25						
74	1.10						
75	0.86						
76	0.42						
77	0.20						
Pico V				Pico V			
87	0.36 ng/ml			87	0.340 ng/ml		
88	0.59			88	0.650		
89	1.26			89	0.970		
90	1.63			90	1.340		
91	2.19			91	1.960		
92	3.39			92	2.750		
93	3.40			93	3.960		
94	4.16			94	4.750		
95	3.95			95	4.190		
96	2.77			96	3.320		
97	1.12			97	2.510		
98	0.54			98	1.270		
99	0.25			99	0.520		
				100	0.175		

Pico I: 0.81 ng (2.3%).
Pico II:1.03 ng (2.95%).
Pico III:6.59 ng (18.75%).
Pico IV:1.09 ng (3.1%).
Pico V: 25.61 ng(72.9%).

HCT teóricamente eluida:
36.9 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
35.13 ng (95.2%).

Pico I:0.615 ng (1.94%).
Pico II: 0,655 ng (2.07%).
Pico III:0.865 ng (2.73%).
Pico IV: 0.815 ng (2.57%).
Pico V:28.705 ng (90.69%).

HCT teóricamente eluida:
32.7 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
31.655 ng (96.78%).

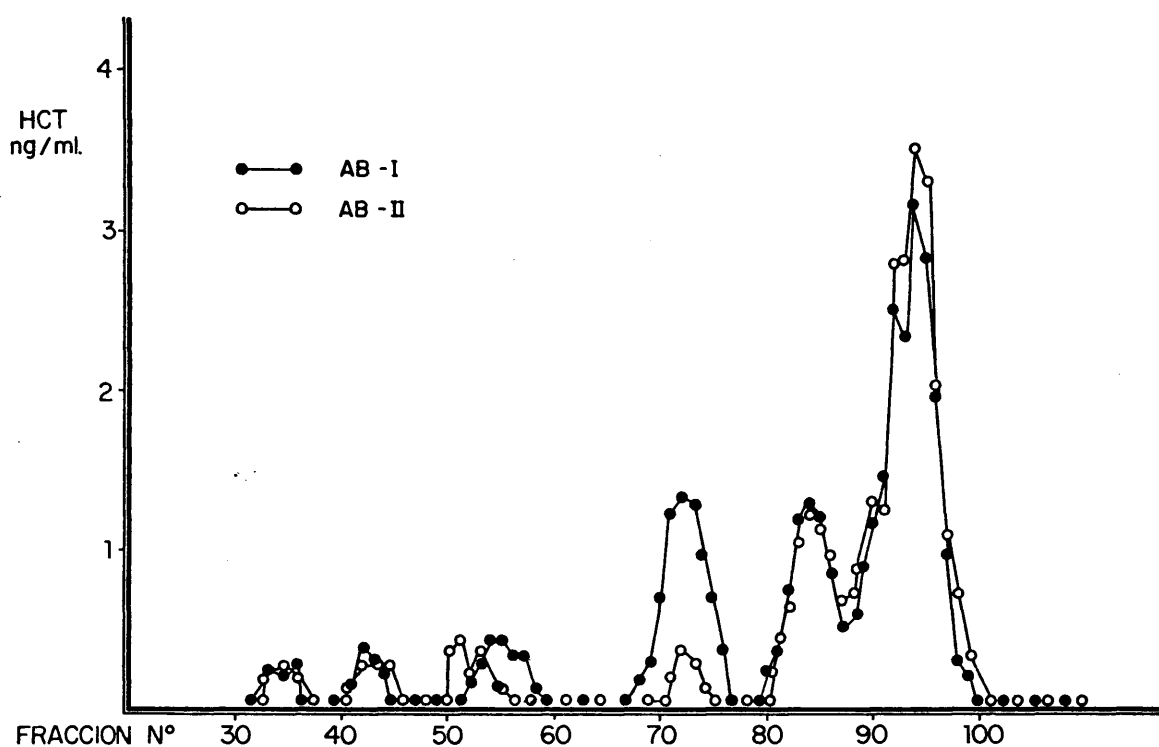


FIG. 33 a - FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G.100 DE SUERO DE UN HIPERNEFRONA (BASAL)

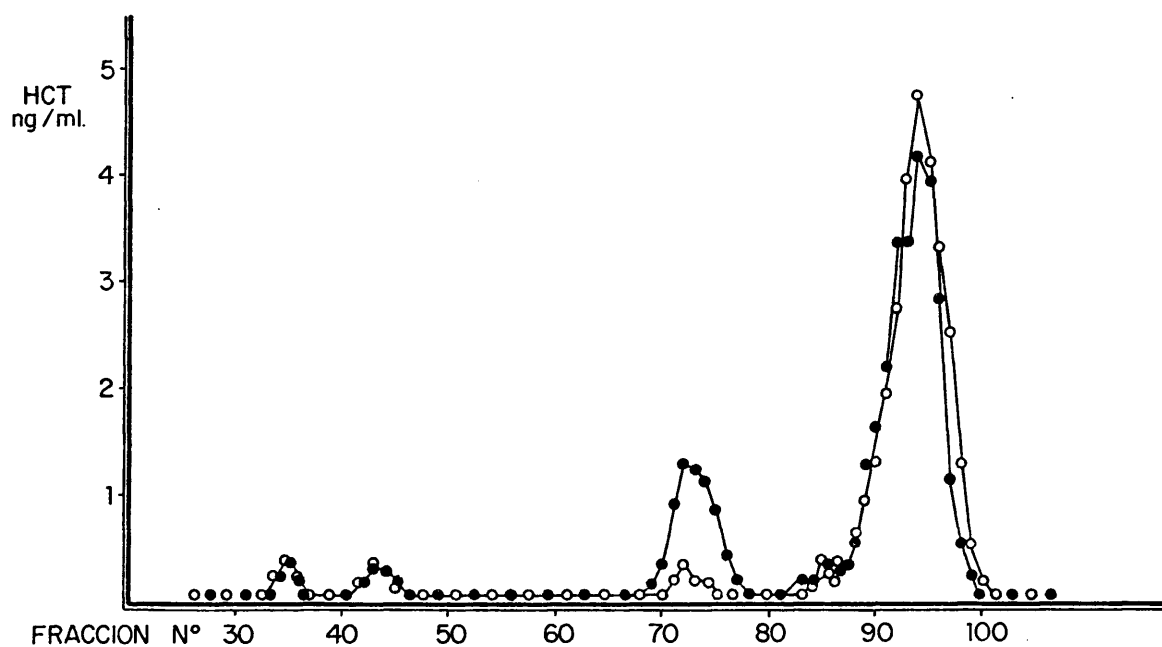


FIG. 33 b - FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G.100 DE SUERO DE UN HIPERNEFRONA TRATADO CON 2-ME 3M Y ELUIDO CON UN BUFFER FOSFATO-UREA 8M.

IV.4-8. NEOPLASIAS DE MAMA.

N=6. \bar{X} edad= 63.5 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)		HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	280	8.6	5.0	4)	Tr.	9,6	4.3
2)	350	8.1	4.2	5)	250	9.9	5.0
3)	1.900	11.2	4.3	6)	480	8.5	4.1

HCT indetectable: 1 caso (16.66%).

HCT significativamente elevada ($p < 0.001$): caso n°3.

r HCT:Ca=0.688 (estadísticamente no significativo).

r HCT:P= -0.257. r HCT:Ca/P=0.755 ($p < 0.05$).

El caso n°3 correspondía a una paciente de 74 años de edad con un carcinoma escirroso de mama con osteolisis metastásica en columna dorsal y parrilla costal con hipercalcemia (11.2 mg%).

IV.4-9. NEOPLASIAS DE COLON.

N=6. \bar{X} edad= 70.5 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)		HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	410	8,1	4.2	4)	Tr.	7.9	4.0
2)	70	9.0	4.8	5)	60	9.4	4.1
3)	115	7.9	5.1	6)	260	9.1	4.6

HCT indetectable: 1 caso, (n°4), (=16.66%).

r HCT:Ca= -0.094; r HCT:P= -0.001; r HCT:Ca/P=-0.081.

IV.4.10. NEOPLASIAS DE PANCREAS.

N= 6. \bar{X} edad= 64.3 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)		HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	105	8.3	4.0	4)	265	7.9	4.7
2)	460	8.0	3.9	5)	190	9.1	4.0
3)	4.850	8.7	5.0	6)	80	9.0	4.8

HCT indetectable: 0 casos.

HCT significativamente elevada ($p < 0.0001$)= caso n°3.

r HCT:Ca= 0.147; r HCT:P=0.598 (no significativo);

r HCT:Ca/P= 0.011.

El caso n°3 correspondía a un varón (M.B.M) de 72 años de edad con un carcinoma de cabeza de páncreas diagnosticado por necropsia, sin metástasis óseas y con un aclaramiento de creatinina de 79 ml/min. No se le practicó la prueba de estimulación con pentagastrina pero en otra muestra de suero obtenida varios días después de la primera tenía 6300 pg/ml. En las tablas 12-a y 12-b se recoge el resultado del fraccionamiento en Sephadex G-100 de una alícuota de suero de este paciente, y graficamente en la figura 32-a y 32-b.

IV.4.11. NEOPLASIAS DE UTERO.

N=6. \bar{X} edad=60.6 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)		HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	380	7.9	2.5	4)	195	8.0	4.1
2)	Tr.	7.9	4.5	5)	290	7.8	3.6
3)	Tr.	8.3	3.9	6)	430	7.9	3.8

HCT indetectable: 2 casos (33.3%).

r HCT:Ca=0,5902 (correlación no significativa).

r HCT:P= 0.6484 (" " ").

r HCT:Ca/P=0.53 (" " ").

TABLA 12-a. FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100

(columna 1.5x60 cm) DE UNA ALICUOTA DE SUERO DE
UN PACIENTE CON UN CARCINOMA PANCREATICO.

(Fracciones de 1ml).

Paciente M.E.M (varón de 72 años).

HCT basal: 4.85 ng/ml (AB-I). HCT basal:3.95 ng/ml (AB-II);

Se eluyeron 4 ml de suero.

Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml	Fracción nº	HCT ng/ml
----------------	--------------	----------------	--------------	----------------	--------------	----------------	--------------

Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
31	0.23	42	0.155	31	0.160	42	0.17
32	0.41	43	0.300	32	0.330	43	0.29
33	0.25	44	0.290	33	0.155	44	0.10
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
69	0.195	82	0.125	72	0.230	82	0.16
70	0.350	83	0.370	73	0.130	83	0.25
71	0.690	84	0.730			84	0.64
72	0.750	85	0.690			85	0.45
73	0.590	86	0.460			86	0.20
74	0.280						
75	0.135						
Pico V				Pico V			
87	0.550	ng/ml		87	0.340	ng/ml	
88	0.680			88	0.450		
89	0.750			89	0.610		
90	1.050			90	1.100		
91	1.150			91	1.350		
92	0.600			92	0.810		
93	1.420			93	1.600		
94	1.300			94	1.150		
95	1.230			95	1.280		
96	0.860			96	1.000		
97	0.510			97	0.730		
98	0.220			98	0.520		
99	0.155			99	0.205		

Pico I: 0.89 ng (5.1%).
Pico II: 0.745ng (4.25%).
Pico III:2.99 ng (17.1%).
Pico IV:2.375 ng (13.6%).
Pico V:10.475 ng (59.95%).

HCT teóricamente eluida:
19.4 ng.

HCT recuperada (picos I-V):
17.47 ng (90.05%).

Pico I:0.545 ng (3.85%).
Pico II:0.56 ng (3.93%).
Pico III:0.36ng (2.53%).
Pico IV:1.6 ng (11.26%).
Pico V:11.145 ng (78.43%).

HCT teóricamente eluida:
15.8 ng.

HCT recuperada (picos I-V)
14.215 ng (89.96%).

TABLA 14-b. FRACCIONAMIENTOS EN SEPHADEX G-100 DE UNA
ALICUOTA DE SUERO, TRATADA CON 2-MERCAPTOETANOL 3M, DE
UN PACIENTE CON UN CARCINOMA PANCREATICO, ELUIDA CON
UN BUFFER FOSFATO-UREA 8M. (Fracciones de 1 ml).

Paciente M.B.M.

Se eluyeron 3 ml de suero.

HCT basal: 4.85 ng/ml (AB-I). HCT basal: 3.95 ng/ml (AB-II).

Fracción HCT Fracción HCT Fracción HCT Fracción HCT
nº ng/ml nº ng/ml nº ng/ml nº ng/ml

Pico I		Pico II		Pico I		Pico II	
32	0.165	43	0.195	32	0.175	43	0.210
33	0.230	44	0.240	33	0.180	44	0.110
Pico III		Pico IV		Pico III		Pico IV	
69	0.180	84	0.160	73	0.13	86	0.240
70	0.330	85	0.130	74	0.12		
71	0.450						
72	0.640						
73	0.450						
74	0.360						
75	0.150						
Pico V				Pico V			
88	0.135 ng/ml			88	0.105 ng/ml		
89	0.335			89	0.250		
90	0.550			90	0.460		
91	0.960			91	1.050		
92	0.890			92	0.740		
93	1.260			93	1.170		
94	1.840			94	1.760		
95	1.650			95	1.160		
96	1.100			96	0.670		
97	0.630			97	0.420		
98	0.300			98	0.340		
99	0.260			99	0.220		
100	0.180			100			

Pico I: 0.395 ng (2.86%).
Pico II: 0.435 ng (3.16%).
Pico III: 2.56 ng (18.6%).
Pico IV: 0.29 ng (2.10%).
Pico V: 10.09 ng (73.28%).

HCT teóricamente eluida:
14.55 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
13.77 ng (94.64%).

Pico I: 0.355 ng (3.15%).
Pico II: 0.32 ng (2.84%).
Pico III: 0.25 ng (2.22%).
Pico IV: 0.24 ng (2.13%).
Pico V: 10.095 ng (89.66%).

HCT teóricamente eluida:
11.85 ng.
HCT recuperada (picos I-V):
11.26 ng (95.0%).

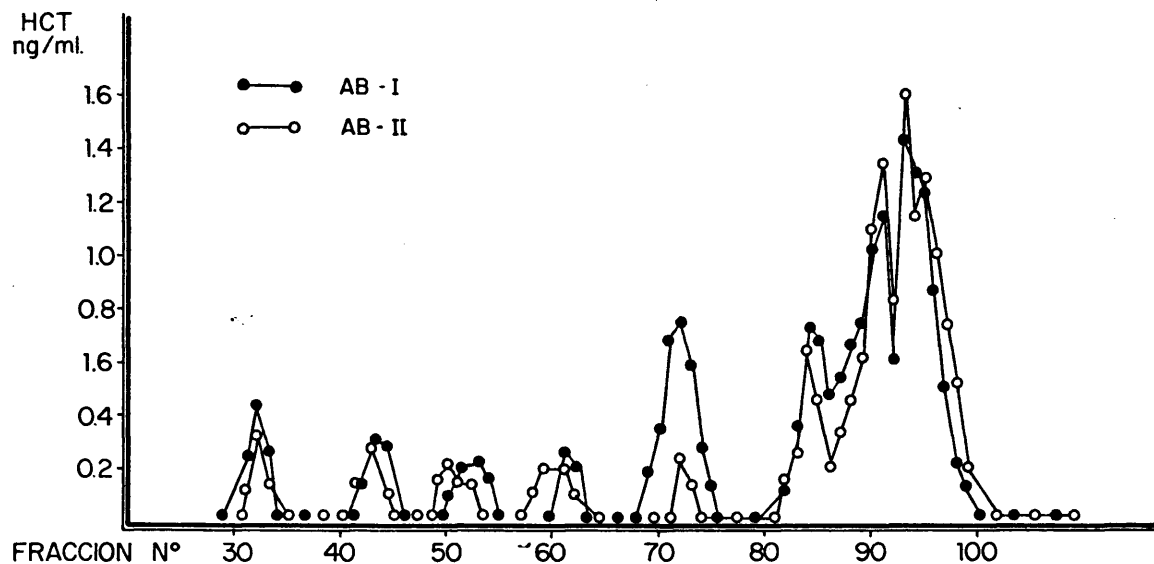


FIG. 32 a - FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G.100 DE UN SUERO DE CARCINOMA PANCREATICO, BASAL.

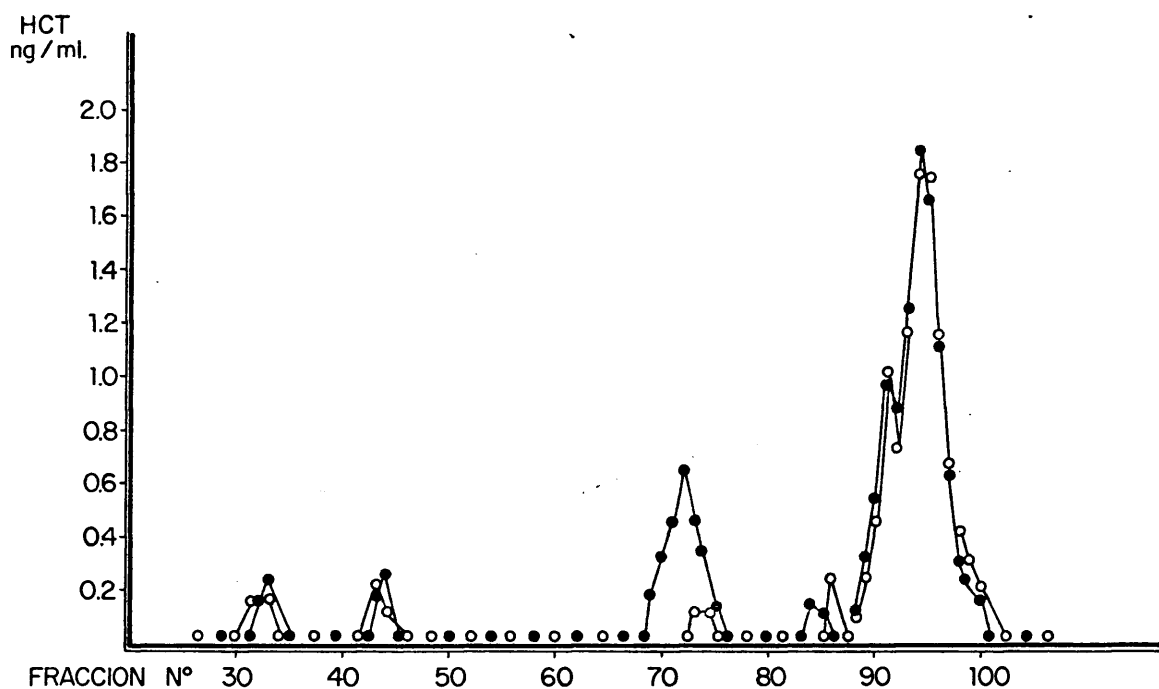


FIG. 32 b - FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G. 100 DE UN SUERO DE CARCINOMA PANCREATICO TRATADO CON 2- ME 3M Y ELUIDO CON UN BUFFER FOSFATO - UREA 8 M.

IV.4-12. NEOPLASIAS DE LARINGE.

N= 6. \bar{X} edad= 53.8 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)		HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	530	9.0	5.1	4)	360	8.3	4.4
2)	Tr.	8.1	4.5	5)	495	7.9	3.9
3)	Tr.	8.6	4.7	6)	Tr.	8.9	3.6

HCT indetectable: 3 casos (50%).

r HCT:Ca= -0.101; r HCT:P= 0.241; r HCT:Ca/P=-0.305.

IV.4-13. NEOPLASIAS DE FARINGE.

N= 6. \bar{X} edad= 68.5 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)		HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	620	8.8	3.8	4)	95	9.0	3.9
2)	190	8.0	4.3	5)	Tr.	8.8	3.7
3)	430	9.1	4.0	6)	265	7.9	5.0

HCT indetectable: 1 caso (16.6%).

El caso n°1 mostró en dos extracciones posteriores niveles de HCT de 450 y 410 pg/ml.

r HCT:Ca= 0.131; r HCT:P= 0.003; r HCT:Ca/P=0.028.

IV.4-14. NEOPLASIAS DE OVARIO.

N=5. \bar{X} edad= 39.4 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)		HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	Tr.	8.0	4.1	4)	475	9.1	4.9
2)	350	8.6	5.0	5)	360	8.6	5.1
3)	75	7.8	4.8				

HCT indetectable: 1 caso (20%).

Correlación HCT:Ca , HCT:Ca/P y HCT:P, no significativa.

IV.4-15. NEOPLASIAS DE ESOFAGO.

N= 5. \bar{X} edad= 58 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%).
1)	110	8.3	4.3
2)	225	7.9	2.1
3)	450	8.8	3.0
4)	190	9.3	4.1
5)	315	8.7	2.6

HCT indetectable: 0 casos.

Correlacion HCT:Ca, HCT:P y HCT:Ca/P no significativa.

IV.4-16. NEOPLASIAS SUPRARRENALES.

N= 5. \bar{X} edad= 36.8 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	95	8.2	3.1
2)	225	8.0	3.0
3)	Tr.	9.1	4.6
4)	430	8.7	5.2
5)	515	7.8	2.9

Solo el caso 3 (una mujer de 32 años con un feocromocitoma unilateral) tenía niveles basales indetectables de HCT.

La correlación entre HCT, calcio, fósforo y cociente Ca/P, no es estadísticamente significativa.

IV. 4-17. NEOPLASIAS CEREBRALES.

N= 5. \bar{X} edad= 44.2 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	420	8.3	4.0
2)	Tr.	9.1	4.1
3)	Tr.	8.7	5.3
4)	485	7.8	3.1
5)	330	9.2	3.9

HCT no detectable: 2 casos (40%).

Correlación HCT:Ca, HCT:P y HCT:Ca/P = no significativa.

IV. 4-18. NEOPLASIAS OSEAS.

N= 5. \bar{X} edad= 28.4 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	530	9.6	4.3
2)	240	9.5	5.0
3)	410	10.1	3.2
4)	2.300	12.6	3.3
5)	160	8.3	4.0

El caso 4 correspondía a un varón de 20 años (M.A.N.N) con un sarcoma osteolítico de fémur con metástasis en ilíaco y columna lumbar.

IV. 4-19. NEOPLASIAS DEL LOBULO ANTERIOR
DE LA HIPOFISIS.

N= 4. \bar{X} edad= 33.5 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	450	8.6	5.0
2)	160	8.0	4.7
3)	85	9.1	4.6
4)	255	7.8	4.8

La correlación entre HCT:Ca, P y Ca/P no es estadísticamente significativa.

IV. 4-20. NEOPLASIAS PLEURALES.

N= 2. \bar{X} edad= 49 años.

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
1)	Tr.	8.2	3.9
2)	105	8.6	4.5

IV.4-21. NEOPLASIAS DERIVADAS
DE LA GRASA RETROPERITONEAL.

N= 1. (58 años).

	HCT (pg/ml)	Ca (mg%)	P (mg%)
	125	7.9	2.9

V. DISCUSSION.

Va. RADIOINMUNOENSAYO DE CALCITONINA,(RIA de HCT).

Las hormonas son sustancias que habitualmente se encuentran en los líquidos corporales en muy bajas concentraciones. Como, además, la sangre posee una composición extraordinariamente compleja si se compara con otros fluidos, se entiende que la determinación cuantitativa de hormonas sea muy difícil en ella. Sin embargo desde 1960 han ido desarrollándose técnicas con suficiente sensibilidad y especificidad para medir los niveles normales, en sangre y otros fluidos, de la mayoría de las hormonas.

Tales técnicas se subdividen, (235) en tres grandes grupos: - bioensayos, - inmunoensayos y, - ensayos químicos, cada uno de los cuales a su vez puede perseguir la medida de la "actividad funcional", o la "actividad biológica" de sustancias hormonalmente activas. Las técnicas "funcionalmente específicas" son empleadas p. ej. en la evaluación de la eficacia terapéutica de preparaciones hormonales de origen biológico o sintético, o en el aislamiento y purificación de hormonas de naturaleza química desconocida.

Frente a las anteriores, el objetivo fundamental de los "ensayos analíticos" es la medida de la concentración de componentes hormonales simples (definidos por una única estructura molecular) en un líquido biológico. Este grupo de ensayos se denomina "estructuralmente específico" frente a las técnicas "funcionalmente específicas", (124). Al tener diferentes finalidades poseen diferentes criterios de validación. Así en los ensayos funcionalmente específicos (p.ej. el bioensayo) es necesario y suficiente que la sustancia standard y la desconocida sean funcionalmente idénticas dentro del sistema biológico utilizado. La validez de

un análisis "estructuralmente directo" depende de un criterio más riguroso: que las sustancias comparadas en el ensayo sean estructuralmente iguales.

Los ensayos "estructuralmente directos" se basan en la interacción entre una zona de la molécula hormonal y un agente físico o químico específico (p.ej. entre la hormona y un anticuerpo, o entre la hormona y la luz). A su vez estos ensayos estructuralmente específicos comprenden dos variedades: a)- ensayos con exceso de sustancia combinante (reagent excess method) y b)- ensayos con exceso de hormona (hormone excess or "saturation assay method").

Dentro de los ensayos estructuralmente específicos con exceso de hormona o métodos de ensayo con saturación (saturation assay methods) se incluye el RIA.

Probablemente el origen del RIA haya que buscarlo en un trabajo de Berson, Yalow y cols. publicado en 1956, (42) en el que comunicaban el hallazgo en sangre periférica de una globulina ligadora de la insulina en los diabéticos tratados crónicamente con insulina.

El RIA (conocido también por una amplia sinonimia: competitive protein binding assay -CPBA-, radioligand assay -RLA-, competitive radioassay, displacement analysis, etc) se basa en la inhibición competitiva por una hormona no marcada de la combinación de la misma hormona marcada con un anticuerpo (AB) específico, (415). La reacción, cuyo esquema se recoge en la página 41, sigue la ley de Acción de Masas, y al final de ella hay una fracción hormonal ligada al AB específico (fracción B), y una fracción F de hormona no ligada al mismo, ($B+F=1$). A medida que la cantidad de hormona no marcada (u hormona fría) se incrementa, el AB disponible para combinarse con la hormona marcada (H^*) disminuye, y consiguientemente también disminuye la fracción B ($B=AB.H^*$); es decir,

cuando H aumenta, B disminuye y F aumenta.

A partir de una curva estandard que relaciona concentraciones de hormona fria con un cociente ($B/F, B/B_0, B/T$) calculado experimentalmente, se puede deducir la concentración hormonal (H) en una muestra dada.

Es preciso sin embargo hacer algunas consideraciones sobre los distintos elementos del RIA.

La hormona marcada o trazador (H^*) se obtiene incorporando un isótopo radiactivo a la molécula de hormona fria (H). Generalmente el radioisótopo utilizado es I^{125} que se caracteriza por poseer una vida media de 60 días muy apropiada para el RIA, y emitir una radiación gamma que permite el empleo de detectores de pequeño volumen y facilitar la construcción de contadores de costo y volumen reducidos.

El yodo radiactivo se incorpora a proteínas y polipéptidos por iodación de residuos de tirosina o histidina de su molécula. Para que esto se produzca se necesita que el isótopo, habitualmente suministrado en forma de yoduro sea oxidado para pasar a yodo elemento. El procedimiento de mayor utilización, y también el seguido por nosotros, es el de la oxidación del yoduro con Cloramina T, método introducido por Greenwood y Hunter (164,200).

Otro método relativamente reciente de marcaje es el llamado método electrolítico utilizado tanto en Calcitonina de Salmón como en HCT (337,338). descrito por Sammon y cols (333), con el que una disolución de IK marcado con I^{125} , equimolar con la solución hormonal y colocados ambos en una misma cubeta son sometidos a una diferencia de potencial. Parece ser que así se han conseguido trazadores de alta estabilidad.

Un factor que debe ser tenido en cuenta es la actividad específica (A.E) o radiactividad por unidad de peso del trazador. Cabría pensar que cuanto mayor sea la A.E de un trazador mayor sería la sensibilidad de un RIA, pero ello no es siempre así. No cabe duda de que el empleo de un trazador de elevada A.E permite reducir el volumen del mismo introducido en el ensayo y acorta también el tiempo de conteo de cada muestra; sin embargo, cuando el tiempo de conteo de la muestra no tiene consecuencias prácticas, y cuando la reducción en la concentración del trazador no incide en la precisión de una medida, el incrementar la A.E no aporta ninguna ventaja. Estas circunstancias se dan cuando la concentración de hormona fría es cero, momento en el que la precisión del ensayo viene determinada por otros factores como la constante de equilibrio de la reacción, el volumen de incubación de las muestras y el tiempo de conteo de las mismas (123).

El límite superior en la A.E de un trazador está dado por el número de átomos de isótopo que pueden ser incorporados a la molécula hormonal, y por la actividad específica del isótopo utilizado. Así, en las hormonas proteicas la introducción de múltiples átomos de radio-isótopo en la molécula reduce sensiblemente su combinación con el AB, especialmente si los residuos de tirosina forman parte de los determinantes antigénicos, y en consecuencia se reduce la sensibilidad de ensayo, siendo preferible por tanto reducir la incorporación de isótopo a un átomo por molécula.

Otro motivo para evitar A.E excesivamente altas es el llamado "decay catastrophe", (417), que ocurre cuando se incorporan 2 ó más átomos de isótopo a cada molécula hormonal. En tal circunstancia se produce la desintegración del primer átomo activo que conduce a la dislocación química de la molécula que lo albergaba, originándose fragmentos radiactivos inadecuados para su utilización en el RIA.

La máxima A.E de HCT* obtenida por

nosotros en los 26 marcajes de HCT realizados fué de 480 mCi/mg (232-480, \bar{X} = 371 mCi/mg), y no observamos diferencias significativas en la estabilidad del trazador ni en la sensibilidad de las curvas standard obtenidas utilizando trazadores de tan distintas A.E.

Los procedimientos de marcaje y purificación utilizados en nuestro RIA poseen la ventaja de su simplicidad. Desde que iniciamos la preparación de los elementos del marcaje hasta que disponemos del trazador apenas pasan dos horas. La purificación transcurridos 10 días desde el marcaje llevada a cabo con la resina de intercambio aniónico AG.IX10 libera al trazador de la fracción de isótopo libre originada durante el almacenamiento, sin que disminuya por ello la sensibilidad de las curvas standard.

El anticuerpo (AB) es otro de los elementos fundamentales del RIA. Los polipéptidos de Pm superior a 10.000 daltons (1 dalton=peso de un átomo de Hidrógeno) suelen poseer suficiente capacidad inmunogénica como para que al ser inyectados al animal de laboratorio éste produzca anticuerpos frente a la sustancia inoculada. Sin embargo, cuando su Pm es inferior a 5.000 suele recurrirse a ligar la molécula del polipéptido a sustancias como la carbodiimida (155), coadyuvante completo de Freund, polilisina (175,376), albúmina de huevo (124), etc. Estas sustancias estimulan inespecíficamente la producción por la médula ósea de beta linfocitos, células que son precursores esenciales de las células plasmáticas elaboradoras de los AB,(325). También han podido obtenerse AB frente a péptidos pequeños como el Glucagon o la Arginina-vasopresina sin necesidad de copularlos a tales elementos coadyuvantes (418

A pesar de que Berson y Yalow (46) consideran superior el cobaya al conejo para la producción de AB frente a hormonas humanas, los dos AB con los que hemos trabajado fueron obtenidos respectivamente en conejos y cabras y demostraron una gran especificidad.

El título o dilución a que es utilizado un AB (o concentración del AB) no es decisivo en un RIA, ya que la medida de bajas concentraciones hormonales viene dada por la caída inicial en la curva estándar y tal caída inicial está relacionada con la constante de equilibrio K, y a su vez la sensibilidad del AB es una función de K. Es decir, lo que tiene importancia es la energía de combinación del AB más que su concentración. Esto es algo que hemos podido comprobar con nuestros dos AB. Mientras que el AB-I es utilizado a una dilución óptima de 1/5.000 y posee una Kd de 2.4×10^9 l.mol, el AB-II lo es a una dilución 1/400 y posee una Kd= 1.5×10^{10} l.mol, consiguiéndose con ambos una sensibilidad para las curvas estándar muy similar.

La especificidad del AB se estudia:

a) exponiéndolo a la reacción con sustancias ante las que a priori cabe esperar reacción cruzada, y
b) realizando las pruebas de identidad inmunológica entre muestras y estándares. Sin embargo, ninguno de estos dos métodos por sí solo ni en combinación con el otro garantiza la especificidad del AB ni la validez de un resultado. El primero de los sistemas depende del conocimiento de las sustancias presentes en la muestra estudiada potencialmente reaccionantes con el AB, y de la disponibilidad de dichas sustancias en forma pura, pero no garantiza la especificidad. Pueden deducirse reacciones cruzadas equivocadas como la comunicada por Jacobs y Lawton (205). Estos autores hallaron reacción cruzada de un AB anti-LH frente a LH marcada y una preparación altamente purificada de TSH; sin embargo, en un sujeto al que se le administró TRH y consecuentemente se elevó la TSH, no se modificó la combinación de AB y LH como si se estuviera en ausencia de TSH.

Un factor de importancia en un RIA es el tiempo de incubación de los elementos. Fundamentalmente hay dos métodos o técnicas de incubación: a) técnicas de

equilibrio, y, b) técnicas de saturación secuencial. Mientras en las primeras la reacción se inicia con todos los elementos del ensayo presentes desde el inicio del mismo, las técnicas de saturación secuencial interrumpen la incubación antes de que se alcance tal equilibrio, (430, 431). En nuestro RIA de HCT iniciamos el ensayo con la hormona fría y el AB y una vez que este tiempo ha alcanzado el equilibrio añadimos el trazador, y terminamos la incubación antes de que se alcance nuevamente el equilibrio entre los tres reaccionantes. Los tiempos de incubación para ambas etapas que han permitido la mayor sensibilidad para las curvas estándar han sido 3 ó 4 días y 2 días respectivamente. La importancia de prolongar la segunda parte del ensayo la hemos comprobado al ver que 12 horas más de incubación supone un notable aplanamiento en las curvas estándar con disminución de su sensibilidad, o mínima cantidad de hormona detectada, de 60 a 1.000 pg/ml.

Hay además otros factores no hormonales con influencia en un RIA. La temperatura, fuerza iónica y pH del medio, anticoagulantes y proteínas plasmáticas (o séricas) influyen de forma notable en los resultados. Por ello se intenta neutralizarlos en lo posible buscando sistemas en los que la temperatura no se modifique (incubaciones en cámara fría a 4°C, o a 37°C en baño maría), y utilizando búffres con poder tamponante que evitan variaciones en la fuerza iónica y pH del medio.

Muchos RIAs de HCT emplean plasma humano libre de HCT en el buffer del ensayo al que añaden Trasylol como inhibidor de la Plasmina y Tripsina (46). A pesar de ello creemos que es imposible asegurar que así se anula la influencia de las proteínas plasmáticas en la reacción AB-HCT*-HCT, y sobre todo, que la variación en el contenido proteico de unos plasmas a otros impide uniformar los resultados ya que es imposible prever la acción proteolítica de un plasma. Por ello, del mismo modo que otros autores, empleamos en el buffer del ensayo albúmina bovina al 0.5%, con

lo que se aporta una cantidad invariable de proteína en todos los ensayos.

Ha sido comprobado por Habener y cols. (173) y Baylin y cols. (34) como la actividad inmunológica de la HCT disminuye rápidamente cuando se incubaba in vitro con plasma o con suero. Tal inactivación, que es mayor para las calcitoninas porcina, bovina y ovina (50% de inactivación a las 3 horas a 25°C) que para la SCT y HCT (50% de inactivación a las 30 horas a 25°C), se debe probablemente a la acción de enzimas ya que: -- la velocidad de inactivación depende de la temperatura, pH y volumen de plasma, -- la inactivación puede evitarse calentando el plasma a 56°C durante 30', y -- el análisis de un fraccionamiento en Sephadex muestra que el descenso en la inmunoreactividad de HCT se correlaciona con la aparición de fragmentos más pequeños que el monómero de HCT.

Para evaluar en su justa medida la importancia que sobre el RIA poseen las proteínas plasmáticas (tanto el plasma incluido en el buffer del ensayo como el plasma en el que se va a medir una hormona) es necesario recordar el trabajo de Argemi y cols. publicado en Acta Endocrinologica, (21). En él comprueban como el plasma interfiere de forma importante en el RIA causando un descenso en la sensibilidad del mismo.

Bieler y cols. (47) intentaron evitar tal interferencia extrayendo la HCT plasmática por diálisis y tratando el plasma con QUSO-G32 para adsorber la HCT; sin embargo según sus resultados el QUSO no resultó absolutamente específico para el monómero de HCT ya que algunos componentes HCT-like extratiroideos fueron medidos a pesar de extraer la HCT plasmática con dicha sílice.

Como método de separación de las fracciones libre y ligada hemos empleado sistemáticamente el Carbón Activado (Sigma Chem.) después de comprobar que tanto el Polietilenglicol al 12.5% (112) como el Dioxano al 66% (172, 174) ofrecían una peor reprodu-

El Carbón Activado es una sustancia relativamente barata y de fácil aplicación a grandes muestras, que fué utilizado por primera vez por Ekins para la vitamina B12 (122) y por Herbert en el RIA de Insulina (113,184). El mayor inconveniente de éste procedimiento (por otra parte común a la mayoría de los adsorbentes sólidos) es que puede alterar el equilibrio químico especialmente en sistemas con alta velocidad de disociación. Este efecto indeseable se evita manteniendo baja la temperatura de incubación durante la adición del Carbón Activado y procurando que el tiempo de exposición al mismo sea igual para todos los tubos del ensayo.

Finalmente nos queda por tratar dentro de este apartado el controvertido tema del procesamiento de datos y cálculo de resultados.

El empleo de métodos gráficos solamente o la interpolación lineal entre puntos adyacentes en la curva dosis-respuesta (curva standard) no proporciona una utilización de los datos. Para Rodbard y Frazier, a quienes seguimos en este punto, tales métodos no permiten estimar con precisión las concentraciones hormonales, están sujetos a la predisposición subjetiva y reducen una parte importante de la información sobre el ensayo,(324). La curva standard de un RIA posee dos graves inconvenientes; por un lado su no linealidad y por otro el de la variación no uniforme (p.ej., la dispersión alrededor de la curva depende del propio trazado de la curva standard).

Estos problemas han sido tratados de solucionar de diferentes formas. Así, Wilson y cols. (412) intentaron ajustar las curvas standard basándose en la Ley de Acción de Masas, pero éste método tiene en contra la heterogeneidad de los lugares de unión, el diferente comportamiento de las hormonas fría y marcada y los errores en la separación de las fracciones libre y ligada. Otros autores como Taljedal (377) y

y Tamarit (381) han ajustado las curvas; a la ecuación de la hipérbola y obtubieron buenos resultados. Rodbard y cols. (323) idearon la tranformación logit-log que consiste en que cuando Y es un decimal, mayor que cero y menor que uno, se puede escribir:

Logit Y = $Y' = \log_e \frac{Y}{1 - Y}$, y si $Y = B/B_0$, X= concentración de hormona fria y a y b son dos constantes, la expresión se transforma en:

$$Y' = \text{logit } Y = a + b.$$

Este método logit-log necesita partir de buenas estimaciones de B_0 y N que son consideradas "constantes" en el ajuste de la curva y el cálculo de la dosis. Para ajustar las estimaciones iniciales de B_0 y N, Rodbard utiliza métodos estadísticos y llega a la expresión, (324):

$$y = \frac{a - d}{1 + (x/c)^b} + d$$

en la que a corresponde a la respuesta (cpm ligadas) cuando x = 0 (equivaldría por tanto a B_0), d corresponde a N (cpm ligadas cuando $x = \infty$), c = concentración de hormona cuando $B/B_0 = 0.5$, y b corresponde a los tiempos de caída multiplicados por (-1) de logit y frente a log x.

Nosotros hemos ajustado las curvas estandard a hipérbolas de ecuación $(y - a)(x + b) = K$ (381) en las que a son las cpm/1000 correspondientes al binding inespecífico, b representa la posición de la asíntota vertical en el lado de las abscisas negativas, y K es una constante.

La concentración de HCT en una muestra cualquiera calculada por tres métodos diferentes (1º: a partir de la curva estandard que relaciona $\%B/B_0$, 2º: ajustando la curva a la ecuación de la hipérbola, y 3º: utilizando el sistema logit-log) fué respectivamente: 0.500, 0.570 y 0.448 ng/ml.

V.b. NIVELES BASALES DE HCT.

Ya hemos visto en el apartado anterior la gran cantidad de factores que intervienen en un RIA y como pueden presentarse dificultades y controversias hasta en el cálculo de resultados. Podría pensarse por todo ello que se trata de una técnica frágil y poco fiable. Sin embargo, la introducción de los llamados criterios de validación (precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad) conceden al RIA suficientes garantías como para ser aplicado a la determinación cuantitativa de hormonas.

Aún hoy, diez años después de que Deftos, Lee y Potts comunicaran el primer RIA de HCT (aplicado a calcitonina porcina - 107-) no hay un acuerdo completo sobre los límites reales en los que se mueven los niveles basales normales de HCT. Para algunos autores más del 50% de las personas normales poseen niveles basales de HCT indetectables, mientras que otros dan como cifras normales hasta 1.000 pg/ml (21 , 136 , 351).

La heterogeneidad de la HCT endógena, la diferente afinidad de los AB utilizados, el reconocimiento por los AB de distintos puntos de combinación en la HCT, la interferencia inespecífica de los sueros ensayados, y el empleo de standards de hormona fría de diferente actividad y pureza, pueden explicar la diversidad de resultados comunicados por los distintos investigadores.

El nivel medio basal de HCT hallado en nuestro RIA está de acuerdo con muchos de los publicados en la literatura, así como el porcentaje inferior al 10% de individuos normales con cifras basales de HCT indetectables, (21 , 143 , 351). Por este motivo, y además cumplir los criterios de validación, hemos aplicado este RIA a la clínica humana.

Ya se vió en la introducción de este trabajo (página 5) como en el tiroides se halla, además de las células de los folículos tiroideos, un tipo de células epiteliales que posee un origen embriológico ectodérmico y al que por su localización próxima a las foliculares Nonidez denominó parafoliculares. Estas células significan aproximadamente el 1 por mil de la masa celular del tiroides normal y son las productoras de calcitonina (HCT). Son por tanto las neoplasias derivadas de las células parafoliculares las que cursan con niveles de HCT más elevados.

En el conjunto de neoplasias en las que determinamos HCT 14 eran primitivamente tiroideas demostradas por la histopatología. De estas catorce, siete eran carcinomas no medulares (ca. indiferenciados, adenocarcinomas foliculares, papilares y anaplásicos), y siete eran carcinomas medulares. De los siete carcinomas no medulares uno mostró niveles basales de HCT indetectables, y otro poseía niveles significativamente elevados; éste último paciente tenía un carcinoma anaplásico que había metastatizado en huesos y pulmones y cursaba con una discreta hipercalcemia (10.8 mg%); su aclaramiento de creatinina (70 ml/min) era normal y la presencia de metástasis osteolíticas pudo justificar la cifra elevada de HCT, lo que motivó, junto con su mal estado general, el que no se le practicara una prueba de estimulación con pentagastrina.

A cuatro de los pacientes con carcinoma tiroideo no medular se les realizó la determinación basal de HCT y la prueba de estimulación con

pentagastrina antes de efectuar el diagnóstico histológico, de forma que la sospecha de carcinoma no medular se apuntaba antes de conocer su histopatología. En los otros tres casos la determinación de HCT y la prueba de estimulación fueron hechas después de conocido el diagnóstico anatomopatológico.

Los niveles basales de HCT en pacientes con carcinomas tiroideos no medulares se mantenía en general dentro de límites normales y la pentagastrina apenas elevó dichos niveles.

Los siete carcinomas medulares tiroideos poseían una HCT basal extraordinariamente elevada. Uno de ellos fué diagnosticado por nosotros al hacer la determinación de HCT basal y una prueba de estimulación con pentagastrina; se trataba de una muchacho (M.E.A.G) de 24 años que fué estudiado al ser diagnosticado un hermano suyo de carcinoma medular tiroideo. Los seis restantes pacientes habían sido diagnosticados por el anatomatólogo tras exéresis quirúrgica del tumor y/o de las adenopatías cervicales metastáticas, aunque en uno de ellos (C.S.N) la confirmación de recidiva del tumor la hicimos al medir HCT cuando aparecieron adenopatías cervicales transcurridos diez años desde una tiroidectomía total.

En la extraordinaria serie de 562 casos revisada y publicada por Ibanez y cols en 1967 (202) había 52 carcinomas medulares (9.25%). Las características que describían en estos tumores eran:

- 1) incidencia igual en hombres que en mujeres,
- 2) no se mezclan con otros tumores tiroideos,
- 3) son bien circunscritos, no capsulados, y a veces infiltran difusamente el parénquima tiroideo,
- 4) histológicamente pueden ser confundidos con carcinomas de células pequeñas de bronquio y con carcinoides,
- 5) son los únicos tumores tiroideos que contienen amiloide,

- 6) el 17% son de la variedad celular, 30% son intermedios y el resto (53%) son fibrosos (carcinoma sólido) presentando a veces calcificaciones en su seno,
- 7) poseen una rica red de linfáticos que atraviesan la cápsula tiroidea,
 - 8) suelen afectar a ambos lóbulos tiroideos,
 - 9) metastatizan en linfáticos del cuello y mediastino, hígado, pleura y huesos, y pocas veces en parénquima pulmonar. A veces comprimen o infiltran tráquea como cualquier otro tumor tiroideo,
 - 10) se asocian ocasionalmente a feocromocitoma, hiperfunción paratiroidea, carcinoides y rara vez a síndrome de Cushing.

Finalmente estos tumores producen HCT, Histaminasa (enzima que desamina a la Histamina y Putrescina) y Dopa decarboxilasa, habiéndose comprobado como la inhibición de este enzima reduce la secreción basal ,y tras estimulación, de HCT (¿el tumor precisa ese enzima para producir HCT?).

Algunas de estas características hemos podido comprobarlas en nuestra reducida serie de 7 carcinomas medulares tiroideos (CMT). Así cuatro eran varones y tres mujeres, seis poseían adenopatías cervicales metastáticas, solo uno había metastatizado en huesos (frente a cuatro de los siete ca. no medulares), y los siete poseían niveles basales de HCT significativamente elevados. Además en todos ellos se obtuvo una respuesta similar ante la inyección i.v rápida de pentagastrina, elevándose en más de 600 % la cifra basal de HCT, mientras que con la infusión prolongada de calcio tal incremento no llegó al 300 %.

El por qué de esta respuesta a la pentagastrina, muy superior a la obtenida con el calcio, no es conocido aunque haya sido observado este hecho por muchos autores,(136 ,182 ,263). La pentagastrina, pentapéptido que contiene el extremo carboxi-terminal de la gastrina y conserva su actividad biológica, al causar un incremento selectivo en el flujo

sanguíneo intestinal por la arteria mesentérica superior (343) aumenta la secreción de la mucosa gástrica y de toda la mucosa intestinal; pero si se acepta esta vía para justificar la elevación plasmática de HCT tras la inyección de pentagastrina habría que admitir que el aumento en los niveles de HCT en los pacientes con CMT se debe a la secreción de HCT por células de la mucosa intestinal y no por las células parafoliculares lo cual va en contra de todos los supuestos. ¿Por qué en individuos normales la pentagastrina aún elevando las cifras basales de HCT no depara los grandes niveles observados en los pacientes con CMT?; ¿la pentagastrina actúa directamente sobre las células parafoliculares tiroideas?; ¿toda la HCT detectada en CMT procede del tiroides, o también una parte de ella es producida en el intestino?.

Otro hecho que hemos podido comprobar es la heterogeneidad de la HCT circulante. Los fraccionamientos en Sephadex G-100 de sueros de pacientes con CMT han permitido comprobar como en condiciones basales hay al menos cinco formas circulantes de HCT en sangre periférica. La forma de mayor Pm (Pico I) eluye en el volumen vacío de la columna y representa entre el 1,9 y el 4% ($\bar{X}=2,78\%$) del total de HCT detectada con el AB-I, y entre el 2,2 y 5,5% ($\bar{X}=3,87\%$) por el AB-II. Podemos suponer que, dado el elevado Pm (mayor de 150.000) de las sustancias que eluyen en el volumen vacío de la columna de Sephadex G-100, lo que se detecta en esas fracciones es HCT ligada a globulinas u otras proteínas de alto Pm. Este pico apenas se modifica cuando el suero es tratado con 2-Mercaptoetanol 3M y eluido con un buffer fosfato-urea 8M, lo que prácticamente descarta el que se trate de macroagregados del monómero de HCT en cuya formación intervengan puentes disulfuro o enlaces hidrógeno.

El pico que eluye inmediatamente detrás del pico I, (pico II que como el pico I es detectado en todos los casos en los que se realizó el fraccionamiento), lo hace muy próximo a la zona de elución de la albúmina humana (fracciones 39 a 46) y representa entre el 2,1 y el 3,9% ($\bar{X}=3,13\%$) de la HCT medida por el AB-I, y entre el 2,95 y 6,42% ($\bar{X}=3,98\%$) de la detectada por el AB-II. Cabe pensar que un % pequeño, inferior al 5%, de la HCT medida en sangre periférica va ligada a la albúmina o proteínas de Pm semejante.

Entre las fracciones 65 y 80 eluye el pico III; representa entre el 31 y el 47% ($\bar{X}=38,6\%$) de la HCT detectada por el AB-I y entre el 5 y 9% ($\bar{X}=7,24\%$) por el AB-II. Esta gran diferencia entre la HCT medida por los dos AB la atribuimos a que el AB-II posee una menor afinidad por la fracción de HCT que eluye en este pico si compara con el AB-I. Esta fracción inmunoreactiva debe poseer un Pm aproximado de 14.000, lo que concuerda plenamente con los resultados descritos hasta ahora en la literatura. Snider y cols. (361) han encontrado una fracción con un Pm aprox. de 14.600, Singer y Habener (357) hallaron una con un Pm de 12.000, Moya y cols. (268) trabajando con CT de pollo hallaron un precursor biologicamente activo con un Pm de 13.500, y Silva y cols (352) describieron por fraccionamiento en Sephadex G-75 una fracción de Pm = 14.000.

Este pico III es estable frente al 2-ME 3M y urea 8M lo que descarta su composición a expensas de monómeros de HCT unidos por puentes disulfuro o enlaces hidrógeno, y aunque no hemos estudiado su actividad biológica ni su posible conversión en monómero de HCT, cabe pensar por lo visto más arriba que se trata de un precursor de HCT.

El pico IV eluye entre las fracciones 80 y 87 ($K_{av}=0,76$) y representa entre el 12,6 y el 19,7 ($\bar{X}=16,3\%$) de la HCT medida con el AB-I, y entre el 19,1 y 31,68% ($\bar{X}=24,67\%$) por el AB-II. A pesar de esta

diferencia en el % de HCT medida por cada AB, la cantidad absoluta cuantificada por cada AB es muy similar; al ser inferior la HCT total medida por el AB-II (a expensas de una menor detección del pico III), el porcentaje de las fracciones IV y V es superior al de las fracciones IV y V medidas por el AB-I.

El Pm de este pico IV está alrededor de 7.000 daltons, aproximadamente el doble del monómero de HCT. Dado que este pico prácticamente desaparece cuando el suero es tratado con 2 ME 3M, que rompe los puentes disulfuro y no los enlaces hidrógeno, puede deducirse que se trata de un dímero de HCT formado por dos monómeros de HCT ligados por puentes disulfuro. Cuando el suero es incubado con 2 ME no solo disminuye el pico IV, sino que se incrementa el pico V lo que permite pensar que se ha producido una conversión dímero \longrightarrow monómero.

Finalmente se recoge por fraccionamiento en Sephadex una última fracción inmunoreactiva que eluye con el mismo Kav (0.88) que el monómero de HCT y representa entre el 28 y el 51% ($\bar{X}=39,3\%$) de la HCT detectada por el AB-I, y entre el 51,1 y el 68% por el AB-II.

Además de estos cinco picos inmunoreactivos cuyo hallazgo es constante en todos los casos de CMT estudiados, eluyen otras fracciones de forma irregular e inconstante, fracciones que cuando el suero es eluido con un buffer fosfato-urea 8M desaparecen indicando su composición a expensas de monómeros de HCT ligados por puentes H.

¿Qué significado tienen estas diferentes formas circulantes de HCT?, ¿son elaboradas así por el tiroides, o son consecuencia del metabolismo del monómero de HCT en sangre periférica?. Estudios realizados por Goltzman y Tischler (154) en cultivos tisulares de CMT indican que las distintas fracciones de HCT son liberadas directamente por el tejido tiroideo y que la agregación de monómeros por enlaces hidrógeno o por puentes disulfuro no es responsable de la

heterogeneidad observada. De las distintas formas de HCT halladas por estos autores en CMT solo una poseía actividad biológica (el monómero de HCT) demostrada por la estimulación de la adenil ciclase en membranas de riñón de conejo. Es necesario sin embargo confirmar esta conclusión de Goltzman y Tischler, ya que es posible que los métodos utilizados para medir la actividad biológica no posean suficiente sensibilidad como para detectar variaciones más pequeñas en la adenil ciclase de membranas de riñón de conejo.

Se realizó la prueba de infusión prolongada de calcio en cinco de los siete pacientes con CMT. En todos ellos se obtuvo una significativa elevación ($p < 0.01$) en los niveles basales de HCT, (pág. 179). Al realizar el fraccionamiento en Sephadex G-100 (tratando previamente los sueros con 2 Mercapto-etanol 3M, y eluyéndolos con un buffer fosfato-urea 8M) observamos la aparición de una fracción inmunoreactiva diferente a las halladas al eluir el suero basal. Esta nueva fracción, a la que podemos llamar pico pre-III, eluye con un K_{av} de 0.45, por lo que debe poseer un P_m aproximado de 22.000, y es detectada en cantidades muy similares por los dos AB, (aunque porcentualmente parezcan grandes las diferencias: 15-22%, $\bar{X}=18.3\%$, para el AB-I, y 27-36%, $\bar{X}=30.6\%$ para el AB-II), (Fig.29-1,-2).

Al llevar a cabo la prueba de estimulación con pentagastrina volvimos a encontrar esta nueva fracción inmunoreactiva (pre-III), que significaba entre el 9.5-y el 12% ($\bar{X}=10.9\%$) de la HCT medida por el AB-I, y entre el 18 y el 25% ($\bar{X}=22.25\%$) por el AB-II, (Fig.30-1,-2,-3).

Con estas pruebas de estimulación no solamente se apreciaba una fracción de P_m superior al del presunto precursor de HCT, sino que además la fracción que sufría un mayor incremento era precisamente el pico III (o pre HCT), mientras que el pico V (monómero de HCT) apenas sufría modificaciones.

Estos dos hallazgos, que no hemos hallado descritos en la literatura nos plantean varios interrogantes. ¿Cuando se efectúa una prueba de estimulación, las células parafoliculares elaboran más precursor de HCT sin que dé tiempo a su transformación en monómero de HCT, o, simplemente liberan el que se halla almacenado en ellas?. ¿Esa "nueva fracción" de mayor Pm, a la que podríamos llamar pre-pr -HCT, qué significado tiene?, ¿podemos suponer que dicha fracción existe basalmente en el tiroides y solamente aparece en sangre periférica tras una prueba de estimulación?. ¿Tal pico pre-III es un precursor del precursor de HCT, y el tiroides lo libera de forma inmadura ante un estímulo, o no es más que la pre-HCT ligada a proteínas?. En este último caso el enlace entre ambos elementos no debería ser por puentes disulfuro ni por enlaces hidrógeno y tal fracción no tendría porqué originarse solo cuando se hace una prueba de estimulación.

Interrogantes similares ya se han planteado con otras hormonas. La "big insulina" y la "big-big insulina", (45 ,233), la "big STH" (156), "big gastrina" y "big-big gastrina" (420 ,424), la "big ACTH" (193 ,421), han sido descritas en condiciones normales o situaciones patológicas y para Yalow y Berson (425) representan moléculas precursoras del monómero hormonal aunque muchas de ellas carezcan de actividad biológica (quizá por ser demasiado grandes para reaccionar con el receptor diana de la hormona).

Parece por tanto que nos encontramos ante un fenómeno común a muchas hormonas peptídicas pudiendo pensarse con Yalow (426) que la síntesis de estas hormonas se hace a través de un precursor de mayor Pm. Sin embargo queda por aclarar: 1º) cuales son los enzimas encargados de liberar la hormona a partir de su precursor y si cada hormona posee un enzima específico; 2º) ¿donde se produce la transformación pre-hormona → hormona: en la glándula originaria, o en sangre periférica?.

Lo cierto es que la heterogeneidad de las hormonas peptídicas constituye una fuente de discordancia entre distintos RIAs, y nosotros mismos hemos observado diferencias significativas entre los niveles de HCT medidos con dos antisueros distintos solamente porque uno de ellos (AB-II) no tiene afinidad por el presunto precursor de la HCT.

V.d. CALCITONINA EN NEOPLASIAS NO TIROIDEAS.

CARCINOMAS BRONQUIALES.

Entre los 173 pacientes con neoplasias no tiroideas estudiadas por nosotros antes de recibir ningún tipo de tratamiento hemos encontrado niveles basales de HCT significativamente elevados en 11. De estos once pacientes cuatro poseían metástasis óseas con mayor o menor hipercalcemia, por lo que la hipercalcitoninemia podía considerarse como reactiva frente a la reabsorción ósea incrementada en las metástasis. Cinco de estos once enfermos poseían carcinomas bronquiales, y si consideramos solo los siete pacientes que no comllevaban metástasis óseas, de ellos cuatro tenían un carcinoma bronquial. Todo ello parece indicar que es en los carcinomas bronquiales donde pueden hallarse con más frecuencia niveles basales de HCT significativamente elevados dentro del grupo de carcinomas no tiroideos. Pero además se da la circunstancia que de los 4 pacientes con carcinoma bronquial, HCT elevada y sin metástasis óseas, tres poseían histología de carcinoma indiferenciado de células pequeñas (o ca. de células en avena = oat cell carcinoma), y el cuarto era un carcinoma indiferenciado de células grandes.

¿Puede suponerse que, en ausencia de masa y/o adenopatía cervical patológica y de osteolisis aumentada, es precisamente el carcinoma bronquial el origen de la HCT circulante?.

En la serie de 136 casos de neoplasias derivadas de tejidos procedentes de la cresta neural (80 de los cuales eran CMT) revisados por Milhaud y cols. (261), cinco eran oat cell de bronquio y todos ellos tenían niveles plasmáticos elevados de HCT. Por otro lado, Silva y cols (353 , 354), que también han estudiado este asunto, han descrito hipercalcitoninemia en el 62% de 26 pacientes con carcinoma de bronquio.

El problema que se plantea es conocer el origen de la HCT detectada; es decir, si es producida por las células parafooliculares tiroideas o por las propias células de la neoplasia bronquial. En un trabajo de Silva y cols, ya citado - 353 -, estos autores demostraban al cateterizar selectivamente las venas que drenaban un carcinoma bronquial y medir ahí la HCT, que era precisamente el tejido neoplásico el productor de la HCT, del mismo modo que Deftos y cols han podido hallar HCT en tejidos neoplásicos no tiroideos, (109) . Pero no se posee habitualmente un acceso fácil al tumor como para realizar sistemáticamente tal cateterización y ulterior medida de HCT en la sangre obtenida directamente de la neoplasia y el problema apuntado al principio de este párrafo se presenta muchas veces.

Un 70% de los pacientes que fueron necropsiados en la serie de Silva y cols. (354) poseían metástasis óseas coincidiendo con niveles normales de HCT, lo que parece descartar que la hipercalcitoninemia sea consecuencia de la osteolisis.

En los dos pacientes de nuestra serie con oat cell carcinoma que fueron neumectomizados la HCT fué indetectable diez días después de la exéresis tumoral, lo que favorece la hipótesis del origen tumoral de la HCT medida en sangre periférica.

Hay otro factor, que quizá pueda tener valor especialmente si se estudia en series más amplias, y es el de la respuesta a la pentagastrina en estos tumores pulmonares. Cuando efectuamos la prueba de estimulación con pentagastrina (página 159) observamos que la máxima elevación en los niveles basales de HCT se producía a los 15' de iniciada la prueba (y no antes de los 5' como en los pacientes con carcinoma medular tiroideo), y, además, tal elevación apenas superó como máximo el 300% del nivel basal. Al llevar a cabo el fraccionamiento en Sephadex G-100 de los sueros basales de estos pacientes, apreciamos que aparecían fracciones o picos inmunoreactivos cuyo volumen de elución era perfectamente superponible a los hallados al fraccionar sueros de carcinomas medulares tiroideos. Así, el pico IV, al que hemos considerado como un dímero de HCT formado por la unión por un puente disulfuro de dos monómeros de HCT, apenas es detectado cuando el suero es tratado con 2-Mercaptoetanol 3M (Fig. 22-a, -b, -c). Las características del pico III (¿pro-HCT?) son también similares a las observadas en los carcinomas medulares tiroideos, ya que mientras el AB-I mide como pico III el 35% de la HCT total, para el AB-II tal fracción no supone ni el 8% de la HCT (Figs. 21-a, 21-b, 21-c; 22-a, -b, -c).

Al fraccionar los sueros obtenidos tras la estimulación con pentagastrina se obtenía el mismo perfil (Figs. 23-1, 23-2) que cuando se cromatografiaron sueros de carcinomas medulares tiroideos después del mismo estímulo (Figs. 30-1, -2, -3). Es decir, la fracción que sufría el mayor incremento era la n° III y volvía a aparecer un nuevo pico inmunoreactivo (pico pre-III) con un K_{av} de 0.45 y P_m aproximado de 22.000 daltons. Aunque el fraccionamiento ofrecía un perfil superponible al de los sueros de carcinomas medulares tiroideos, la respuesta cuantitativa a la pentagastrina era significativamente inferior en los carcinomas bronquiales.

La naturaleza y significado de los distintos picos inmunoreactivos plantea los mismos interrogantes que en los carcinomas medulares tiroideos. Además, no está claro porqué son los carcinomas bronquiales de células pequeñas los que coinciden con más frecuencia con niveles elevados de HCT y de otras hormonas peptídicas. Se ha sugerido que este tipo de neoplasia bronquial deriva de células argentafines emigradas al pulmón desde la cresta neural (40, 406), y por tal motivo estaría capacitado para elaborar (quizá por un mecanismo de des-represión genética) cualquiera de las hormonas peptídicas producidas por glándulas endocrinas derivadas de aquella cresta neural.

En contra de esta hipótesis (que en este momento parece sin embargo la más verosímil) está el hecho de que en neoplasias derivadas de tejidos no ectodérmicos como páncreas y estómago se ha podido demostrar la producción de HCT y PTH, (109) Habría por tanto que suponer, si se admite la hipótesis anterior, que células procedentes de la cresta neural pueden asentar en tejidos no ectodérmicos, y que son precisamente dichas células ectodérmicas las productoras de hormonas peptídicas.

En cualquiera de los casos éste es un campo en el que abundan los puntos oscuros y que se precisan estudios embriológicos, histológicos, fisiológicos y bioquímicos de extraordinaria finura para que puedan ser aclarados.

HCT EN OTRAS NEOPLASIAS NO TIROIDEAS.

Entre diez pacientes diagnosticados de mieloma por historia clínica, mielograma y bioquímica hallamos su caso con niveles significativamente elevados de HCT. Este paciente tenía grandes áreas de osteolisis que justificaban la calcemia basal de 12.7 mg% y probablemente también la cifra de HCT.

Un varón de 65 años de edad (A.M.G) diagnosticado de hepatocarcinoma difuso en la necropsia, poseía una HCT basal de 9.600 pg/ml, significativamente elevada ($p < 0.001$). El fraccionamiento en Sephadex G-100 de 3 ml de suero de este enfermo mostró (Figs.31-1,-b) el mismo número de fracciones inmuno-reactivas, y en la misma zona de elución, que las observadas en carcinomas medulares tiroideos y carcinomas bronquiales. Igualmente, el pico IV se redujo a menos de un 3% de la HCT total detectada cuando el suero fue tratado con 2-Mercaptoetanol 3M. Por otro lado en la necropsia se descartó patología tiroidea asociada al padecimiento fundamental del enfermo.

Entre seis pacientes diagnosticados de tumoraciones renales malignas se encontraron dos con niveles basales de HCT significativamente elevados. Uno de ellos (A.S.M) tenía metástasis óseas y una calcemia de 13 mg%, y ello junto a su mal estado general contraindicó de forma absoluta el hacer una prueba de estimulación con pentagastrina. El otro paciente era una mujer (V.F.M) de 65 años, y el fraccionamiento en Sephadex G-100 de 3 ml de su suero mostró un perfil, (Figs.33-a,-b), en todo similar a los otros casos ya descritos y al obtenido con el suero de un varón de 72 años (M.B.M) diagnosticado en la necropsia de una neoplasia de cabeza de páncreas (Figs.32-a,-b).

A pesar de haberlo buscado intencionadamente en muchos de estos casos no hemos hallado ninguno en el que coincidieran dos endocrinopatías simultáneas. Alguno de ellos, como un oat cell bronquial deparaba una producción ectópica de PTH pero no de HCT, y ninguno de los feocromocitomas en los que tuvimos la oportunidad de medir HCT tenía niveles de esta hormona significativamente elevados. Tampoco ninguno de los siete carcinomas medulares tiroideos se habían acompañado de feocromocitoma hasta el momento de la determi-

nación de HCT, ni de adenoma hipofisario y/o paratiroideo para poder hacer el diagnóstico de Adenomatosis Endocrina Múltiple.

Podemos, por tanto, escribir que entre 187 neoplasias en las que determinamos los niveles basales de HCT no solo los pacientes diagnosticados de carcinoma medular tiroideo poseían valores patológicos de HCT. La necropsia de algunos pacientes con carcinomas no tiroideos permitió excluir la coexistencia con el tumor primitivo de una neoplasia tiroidea de extirpe medular que hubiera podido ser la productora de HCT.

En dos pacientes con niveles basales de HCT significativamente altos la exéresis tumoral se siguió del descenso de la HCT circulante a cifras no detectables por nuestro RIA, lo que nos induce a pensar en el origen tumoral no tiroideo de la HCT detectada.

El fraccionamiento en Sephadex G-100, especialmente después de tratar los sueros con 2-Mercaptoetanol 3M y eluirlos con un buffer fosfato-urea 8M, (que actúan sobre los puntos en los que por su estructura podrían establecerse agregados macromoleculares), permite suponer que la HCT detectada en sangre periférica se compone de varias fracciones de diferentes tamaños y Pm.

.....

Quiero terminar este trabajo haciendo dos citas y planteando dos preguntas que se deducen de lo escrito páginas atrás.

La primera de las citas es el volumen 259 de los Anales de la Academia de Ciencias de Nueva York, en el que se recogen un conjunto de conferencias moderadas por Hidematsu Hirai y Elliot Alpert, tituladas en conjunto "Carcinofetal Proteins: Biology and Chemistry", (19). En este trabajo se repasa la embriología, biología, metabolismo y bioquí-

mica de algunas neoplasias como la Alfa Feto Proteina, el Antígeno Carcinoembriónico y otras proteínas elaboradas por neoplasias experimentales, y aportan conceptos claros para la interpretación correcta de algunos hallazgos clínicos.

La segunda cita es el volumen 2A del Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology. Dirigido por S.A. Berson y R.S. Yalow, se pasa revista en él a las hormonas peptídicas desde los métodos de extracción y purificación a los mecanismos de acción hormonal, pasando por la heterogeneidad y determinación cuantitativa de las hormonas peptídicas.

Ambos trabajos fueron de gran ayuda y guías extraordinariamente útiles para llevar a cabo la labor escrita en estas páginas.

Las dos preguntas que cierran este trabajo, pero que quieren ser como dos puertas abiertas dejadas en él, son: ¿La producción ectópica de hormonas peptídicas por tejidos neoplásicos, es una adquisición patológica o significa la exageración de una capacidad presente ya en potencia en las células normales?. ¿Los precursores de hormonas peptídicas son específicos de cada hormona, o hay un precursor común para grupos de hormonas estructuralmente semejantes?.

VI. CONCLUSIONES.

VI. CONCLUSIONES.

- 1.- La presencia en sangre periférica de niveles elevados de Calcitonina (HCT) no es exclusiva del carcinoma medular tiroideo. Cifras significativamente altas de HCT han sido halladas en neoplasias derivadas de tejidos no tiroideos.
- 2.- Los niveles basales de HCT significativamente más elevados se observan en pacientes con carcinomas medulares tiroideos.
- 3.- La HCT circulante en suero detectada por nuestro RIA, tanto en neoplasias no tiroideas como en carcinomas medulares tiroideos, no es homogénea, ya que se compone de varias fracciones de diferentes pesos moleculares.
- 4.- Por cromatografía en gel de Sephadex G-100 se encuentran al menos cinco componentes. Además de una fracción que eluye en el volumen vacío de la columna y otra que lo hace en el volumen de elución de la albúmina, es constante el hallazgo de otras tres fracciones. De éstas, una (fracción III) eluye en un volumen al que corresponde un peso molecular aproximado de 14.000 daltons; otra, (fracción IV) posee un Pm comprendido entre 6.500 y 7.500, y una última fracción (V) eluye con el mismo K_{av} que el monómero de HCT (Pm aproximado: 3.500 daltons). La fracción III no modifica su volumen de elución al incubar el suero con 2-Mercaptoetanol 3M o al eluir la columna con un buffer fosfato-Urea 8M. La fracción IV practica-

de un dímero constituido por dos monómeros
unidos por puentes disulfuro.

- 5.- Las células neoplásicas no tiroideas a las que se atribuye la producción ectópica de HCT conservan la capacidad de respuesta a la pentagastrina, aunque ésta sea sensiblemente inferior a la de los carcinomas medulares tiroideos.
- 6.- En pacientes con carcinoma bronquial la respuesta a la pentagastrina se produce más tarde que en pacientes con carcinoma medular tiroideo.
- 7.- La heterogeneidad de la HCT en sangre periférica se mantiene, tanto en neoplasias no tiroideas como en carcinomas medulares del tiroides, después de efectuada la prueba de estimulación con pentagastrina. En esta circunstancia se aprecia un claro aumento de la fracción III, que no se modifica al incubar el suero con 2-Mercaptoetanol 3M o eluir la columna con urea 8M. Dado que tal pico inmunoreactivo muy bien puede corresponder por su Pm al precursor de la HCT (Pro-HCT) es correcto suponer que con la estimulación se provoca una liberación aumentada de precursor por el tejido neoplásico.
- 8.- En enfermos con carcinomas medulares del tiroides la infusión prolongada de calcio depara un incremento significativo en los niveles basales de HCT. El perfil cromatográfico de los sueros tras esta prueba de estimulación demuestra un incremento especial de la fracción III (presunto precursor de HCT) y la aparición de un pico inmunoreactivo que es estable frente al 2-Mercaptoetanol 3M y urea 8M. Este nuevo pico eluye con un Kav de 0.45 y por ello debe poseer un Pm próximo a 22.000 daltons.

9.- La estimulación con pentagastrina causa, tanto en enfermos con carcinoma medular del tiroides como con neoplasias no tiroideas, la aparición en sangre periférica de una fracción inmunoreactiva no hallada en condiciones basales que eluye con un K_{av} de 0.45 y debe poseer por tanto un P_m aproximado de 22.000 daltons. Esta fracción es estable frente al 2-Mercaptoetanol 3M y urea 8M.

VII. BIBLIOGRAFIA.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- ABELEV, G. I.; ASSECRITOVA, I.; KRALVSKY, D.; PEROVA, S.;
PEROVODCHIKOVA, N. Int. J. Cancer, 2, 551-558, 1967.
- 2.- ABELEV, G. I. Cancer Res. 28, 1344-1350, 1968.
- 3.- AER, J. Endocrinology, 83, 379-380, 1968.
- 4.- AKOUN, G.; HUCHON, G.; HERSON, S.; MARSAC, J.; ISAAC, R.;
GIRARD, F. Ann. Méd. Interne (Paris), 127, 899-904,
1976.
- 5.- ALBRIGHT, F. N. Eng. J. Med. 225, 789-791, 1941.
- 6.- ALDRED, J. P.; BOBALICK, G. R.; SMITH, C. M.; BASTIAN, J. W.
Fed. Proc. 26, 367, 1967.
- 7.- ALDRED, J. P.; KLESZINSKY, R. R.; BASTIAN, J. V.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134, 1175-1180, 1970.
- 8.- ALDRED, J. P.; KLESZINSKY, R. R.; STUBBS, R. K.; BASTIAN, J. W.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137, 1145-1151, 1971.
- 9.- ALIAPOULIOS, M. A.; SAVERY, A.; MUNSON, P. L.
Fed. Proc. 24, 322, 1965.
- 10.- ALPERT, E.; COSTON, R. L.; DRYSDALE, J. W. Nature, 242,
194, 1973.
- 11.- ALPERT, E.; DRYSDALE, J. W.; ISSLEBACHER, K. J.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 209, 387-396, 1976.
- 12.- AMATRUDA, T. T., Jr. En: Duncan's Diseases of Metabolism.
Eds. Bondy & Rosenberg. W. B. Saunders Co. Pg. 1629-
1650.
- 13.- ANDERSON, L. E.; GLENN, J. F. J. Urol. 95, 1, 1966.
- 14.- ANDREWS, P. BIOCHEM. J. 91, 222-233, 1964.
- 15.- ANDREWS, P. Biochem. J. 96, 595, 1965.
- 16.- ANFINSEN, C. B.; HABER, E. J. Biol. Chem. 236, 1361-1363,
1961.
- 17.- ARDAILLOU, R. J. Clin. Invest. 49, 2345-2352, 1970.
- 18.- ARDAILLOU, R.; PAILLAR, F.; SRAER, J.; VELLE, G.
J. Clin. Invest. 49, 2345-2352, 1970.
- 19.- ARDAILLOU, R.; ISAAC, R.; NIVEZ, M. P.; KUHN, J. M.; CAZOR, J. L.
Horm. Metb. Res. 8, 136-140, 1976.

- 20.- ARGEMI,B;HOURS,M.C;KASBARIAN,M;GRISOLI,J;
CANNONI,M;CODACCIONI,J.L;SIMONIN,R.
Horm.Metab.Res. 9,248-249,1977.
- 21.- ARGEMI,B;HOURS,M.C;EVEN,F;GARGUILO,G;HOLLARD,J.M
Acta Endocrinologica, 88,75-86, 1978.
- 22.- ARNAUD,C.P;TSAO,H.S. Biochem. 8,449,1869.
- 23.- AVRAMIDES,A;BAKER,R;WALLACH,S.
Metabolism,23,11, 1037-1046, 1974.
- 24.- AVRAMIDES,A;FLORES,A;DE ROSE,J;WALLACH,S.
J.Clin.Endocr.Metab. 42, 459, 1976.
- 25.- VRAMIDES,A;BAKER,R;WALLACH,S. Metab.23,1037-
1046,1974.
- 26.- AZZOPARDI,J.G;FREEMAN,E;POOLE,G.
Br.Med.J. 4, 528-530, 1970.
- 27.- BABER,E.C. Philosophical Transactions of the
Royal Society. London. 166,557-568,1876.
- 28.- BAGHDIA NTZ,A. Nature,203,1027-1028,1964.
- 29.- BAILEY,J.L. Techniques in Protein Chemistry.
2th Ed.Elsevier Pub.Co.1967. 1-Pg.123, 2-
Pg.99-100, 3-Pg.118.
- 30.- BALSAM,A;BERNSTEIN,G;GODMAN,J. Gastroentero-
logy,62,636-641,1972.
- 31.- BARGMANN,W. Histología y Anatomía Microscópica
Humanas. Editorial Labor. Segunda ed.1964.
- 32.- BARTLET,J.P;BATES,R.F.L. J.Endocrinol.
63, 407-408, 1974.
- 33.- BARTTER,F.C;SCHWARTZ,W.B. Am.J.Med. 42, 790-
806, 1967.
- 34.- BAYLIN,S.B;BAILEY,A.N;HSU,T.H;FOSTER,G.V.
Metabolism, 26, 1345-1354,1977.
- 35.- BECK,C;BURGER,H.G. Cancer,30,75-79,1972.
- 36.- BECKER,H.D;REDDER,D.D;SCURRY,M.T;THOMPSON,J.C.
Amer.J.Surg. 127, 71-75, 1974.
- 37.- BENN,A.R;WEST,T.E.T. Br.Med.J.1,755,1977.
- 38.- BELL,P.H;BARG,W.F;COLUCCI,D.F;DAVIES,M.C;
DZIBROWSKI,C.ENGLERT,M.E;HEYDER,E;PAUL,R.
J.Am.Chem.Soc. 90,2704-2706,1968.

- 39.- BELL,N.H;VERY,S;JOHNSTON,C.C.R,Jr.
J.Clin.Endocr. 31, 283, 1970.
- 40.- BENSCH,K.J;CORRIN,B;PARIENTE,R;SPENCER,H.
Cancer, 22,1163-1172,1968.
- 41.- BERGER,J.A;MEYNIEL,G;GAILLARD,G;PETIT,J;LAPALUS,F.
Les Molécules Marquées en Médecine Nucléaire.
Actualités de Biophysique et de Médecine Nucléaire.
Masson Ed.1976,pg.26-61.
- 42.- BERSON,S.A;YALOW,R.S;BAUMAN,A;ROTHCHILD,M.A;
NEWERLY,K. J.Clin.Invest. 35, 170-190,1956.
- 43.- BERSON,S.A;YALOW,R.S. Science,154,907-909,1966.
- 44.- BERSON,S.A;YALOW,R.S.J.Clin.Endoc.Metab. 28,1037,
1968.
- 45.- BERSON,S.A;YALOW,R.S.En: Les Adenomes Hypophy-
saires Secretants.Endocrinopathies et Immunologie.
Masson Ed.Paris.1971.pg.239-269.
- 46.- BERSON,S.A;YALOW;R.S.En: Methods in Investigative
and Diagnostic Endocrinology.Ed.Berson & Yalow.
Vol.2A.Noth Holland Pub.Co.1973.Pg.84-120.
- 47.- BIELER,E.U;VAN ROOYEN,R.J;DEBRUIN,E.J.P;HOOG,J.M.C.
Horm.Metab.Res. 5, 231, 1973.
- 48.- BIJVOET,O.L.M;VAN DER SLUYS VEER,J.V.D;JANSEN,A.P.
Lancet,1, 876, 1968.
- 49.- BIJVOET,O.L.M;VAN DER SLUYS VEER,J.V.D;DE VRIES,M;
KOPPEN,A.T.J; N.Eng.J.Med. 284,681,1971.
- 50.- BIRGE,S.J;AVIDI,L.V. J.Clin.Endocr. 29, 213-218,
1969.
- 51.- BLAHOS,J;OSTEN,J;MERTL,L;KOTAS,J;GREGOR,O;
REISENAUER,R. Horm.Metab.Res. 7,445-446,1975.
- 52.- BLAHOS,J;SVOBODA,Z;HOSCHL,C. Endokrinologie ,
(Leipzig). 68,2,226-230,1976.
- 53.- BLOCK,M.B;ROBERTS,J.P;KADAIK,R.G;SEYFER,A.E;HULL,
S.F;NOFELDT,F.D. J.A.M.A234,710-714,1975.
- 54.- BOLMAN,R.M;COOPER,C.W;GARNER,S.C;MUNSON,P.L;
WELLS,S.A. Endocrinology,100,1014-1021,1977.
- 55.- BRAUNSTEIN,G.D;VAITUKAITIS,J.L;CARBONE,P.P.
Ann.Intern.Med. 78, 39-45,1973.

- 56.- BREWER,H.B,Jr;KEUTMAN,H.T;POTTS,J.T,Jr;SCHLUETER,
R.J. J.Biol.Chem.243,5739-5747,1968.
- 57.- BREWER,H.B,Jr;RONAN,R. Proc.Nat.Acad.Sci.USA.
63, 940-947, 1969.
- 58.- BREWER,H.B,Jr. Fed.Proc. 28,383, 1969.
- 59.- BUCKLE,R.M;MCMILLAN,M;MALLINSON,C. Br.Med.J.
14,724-726,1970.
- 60.- BUCKLE,R.M. Clin.Endocr.Metab.3,2,237-251,1974.
- 61.- EUFFE,D;RIMBAUT,C. Ann.N.Y.Acad.Sci. 259,417-426,
1975.
- 62.- BURFORD,H.J;ONTJES,D.A;COOPER,C.V;PARLOW,A.F;
HIRSCH,P.F. Endocrinology,96,340-348,1975.
- 63.- BUSSOLATI,G;PEARSE,A.G.E. J.Endoc. 37,205-209,1967.
- 64.- BYFIELD,P.G.H. Ph.D.Thesis.University of London.
1970.
- 65.- CAMERON,D.A. En: Parathyroid Hormone and Calcitonin.
Ed.Talmage & Belanger.Excerpta Medica Found.
Amsterdam,1968;pg.437-439.
- 66.- CANALE,D.C;DONABEDIAN,R.K. J.Clin.Endoc.Metab.
40, 738-741,1975.
- 67.- CARE,A.D. En:Parathyroid Hormone and Calcitonin.
Ed.Talmage & Belanger.Excerpta Medica Found.
Amsterdam,1968;pg.417-427.
- 68.- CARE,A.D. Endocrinology,83,161-169,1968.
- 69.- CARE,A.D;ANDERSON,L.L;COOPER,C.W;OXENREIDER,S.L;
PHILIPPO,M. J.Endocrinol. 43,679-680,1969.
- 70.- CARE,A.D. Fed.Proc. 29,253,1970.
- 71.- CARE,A.D;BATES,R.F.L;GITELMAN,H.J. J.Endocrinol.
48,1-15,1970.
- 72.- CARE,A.D;BATES,R.F.L;SWAMINATAN,R;GANULI,P.C.
J.Endocrinol. 51,735,1971.
- 73.- CARE,A.D;BATES,R.F.L. J.Endocrinol.XLiii,1973.
- 74.- CARVALHEIRA,A.F;WELSCH,U;PEARSE,A.G.E.
Histochemie,14,34,1968.
- 75.- CASTELL,S;INAMDER,S;BAKER,R;WALLACH,S. J.Pediatrics.
757,5, 1972. 594-600
- 76.- CASTLEMAN,B. N.Eng.J.Med.286,713-719,1972.

- 77.- CASTRILLO,J.M;DE LA CALLE,H;HAWKINS,F.G;RAPADO,A.
En:Metabolismo del Calcio.Ed.Oteo.Madrid,1974.
Pg.263-268.
- 78.- CATTAN,D;BELAICHE,J;MILHAUD,G;KALIFAT,R;ROUGIER,
P;VESIN,P;PAPPO,E;PARROT,M. Nouv.Pres.Med.
3,2391, 1973.
- 79.- CHARBON,G.A;PIEPER,E.E.M.Endocrinology,91,828-831,
1972.
- 80.- CHERNY,S.N;CHAUSMER,A.B;BELLAVIA,J.V;WALLACH,S.
Endocrinology,86,1337-1346,1970.
- 81.- CHOPRA,D;CLERKIN,E.P. Med.Clin.North America.
59,2,441-447,1975.
- 82.- CHRISTY,N.P. En: Tratado de Medicina Interna,
Beeson-McDermott.Edición 14.Editorial Interame-
ricana,1977.Pg.2134.
- 83.- COHEN,R.B;TOLL,G.D;CASTLEMAN,B. Cancer,13,812,1960.
- 84.- COHEN,S,L;GRAHAME-SMIT,D;MAC INTYRE,I;WALKER,J.G.
Lancet,ii,1172,1973.
- 85.- COHN,S.H;DOWBROWSKI,C.S;HANSEN,W;KLOPPER,J;ATKINS,
H.L. J.Clin.Endocr. 33,719,1971.
- 86.- COLLIGAN,J.E;EGAN,M.L;GUYER,R.L;SCHNUTE,W.C;TODD,
C.W. Ann.N.Y.Acad.Sci. 259,355-365,1975.
- 87.- COLLIP,J.B. J.Biol.Chem. 63,395,1925.
- 88.- CONNOR,T.B;THOMAS,W,C;HOWAR,J.E.J.Clin.Invest.
35,697-698,1956.
- 89.- COOMBES,R.C;HILLYARD,C;GREENBERG,P.B;MAC INTYRE,I.
Lancet,i,1080-1083,1974.
- 90.- COOPER,C.W. Endocrinology,82,1015-1020,1968.
- 91.- COOPER,C.W;SCHWESINGER,W.H;MAHGOUB,A.M;ONTJES,D.A.
Science,172,1238-1240,1971.
- 92.- COOPER,C.W;HIRSCH,P.F;MUNSON,P.L. En: Methods in
Investigative and Diagnostic Endocrinology.Non
Pituitary Hormones.Ed.Yalow&Berson,1973.Pg.1003-
1010.

- 93.- COPP,D.H;DAVIDSON,A.G.F;CHENEY,B.A.
Proc.Can.Fed.Biol.Soc. 4,17,1961.
- 94.- COPP,D.H;CAMERON,E.C;CHENEY,B.A;DAVIDSON,A.G;
HENZE,K.G. Endocrinology,70,638-649,1962.
- 95.- COPP,D.H;HENZE,K.G. Endocrinology,75,49-55,1964.
- 96.- COPP,D.H;KUCZERPA,A.V. Fed.Proc.26,368,1967.
- 97.- COPP,D.H;PARKES,C.O. En:Parathyroid Hormone and
Calcitonin.Ed.Talmage & Belanger.ExcerptaMedica
Found.Amsterdam,1968.Pg.74-82.
- 98.- COPP,D.H. En: Calcitonin 1969:Proceedings of the
Second International Symposium.Taylor & Foster Ed.
Heinemann Medical.London,1970.Pg.281-294.
- 99.- COPP,D.H. En:Endocrinology 1971.Taylor Ed.
Heinemann Medical,London 1972.
- 100.- COPP,D.H.En:Methods in Investigative and Diagnostic
Endocrinology.Non Pituitary Hormones.Ed.Yalow &
Berson,1973.Pg.999.
- 101.- COPP,D.H. En:Metabolismo del Calcio.Editorial
Oteo.Madrid,1974;pg.23-34.
- 102.- CORRADINO,R.A. Horm.Metab.Res.8,485,1976.
- 103.- CORRODI,H;HILLARP,N.A. Helv.Chim.Acta.47,911,1964.
- 104.- CRAMER,C.F;PARKES,C.O;COPP,D.H. Can.J.Physiol. &
Pharmacol. 47,181-184, 1969.
- 105.- CROCKER,D.W; VEITH,F.J. Ann.Surg. 161,418-427,1965.
- 106.- DAMBORENEA,R.G.En: Metabolismo del Calcio.Edit.
Oteo.Madrid,1974.Pg.269-278.
- 107.- DEFTOS,L.J:LEE,M.R;POTTS,J.T,Jr. Proc.Nat.Acad.
Sci.USA. 60,293-299,1968.
- 108.- DEFTOS,L.J;ROOS,B.A;BRONZERT,D;PARTHMORE,J.G.
J.Clin.Endoc.Metab. 40.409-412,1975.
- 109.- DEFTOS,L.J;McMILLAN,P.J;SARTIANO,G.P;ABOUI,J;
ROBINSON,A.G. Metabolism,25,543-550,1976.
- 110.- DE LUISE,M;MARTIN,T.J;MELICK,R.A.
J.Endocrinol. 48,181-188,1970.
- 111.- DE LUISE,M;MARTIN,T.J;GREENBERG,P.B;MICHELANGELI,V.
J.Endocrinol. 53,475-482,1972.

- 112.- DESBUQUOIS,B;AURBACH,C.D. J.Clin.Endoc. 33,732-738, 1971.
- 113.- DEVROEDE,G.J;TIROL,A.F. Amer.J.Surg. 116, 130,1968.
- 114.- DOUSA,T.P. Am.J.Physiol. 226,1193-1197,1974.
- 115.- DRYSDALE,J.W;ALPERT,E. Ann.N.Y.Acad.Sci. 259, 427-434,1975.
- 116.- DUBOIS,M;GILLIS,K.A;HAMILTON,J.K;RECKERS,P.A; SMITH,F. Anal.Chem. 28,350-356,1956.
- 117.- DUBRISAY,J;PATRI,B;MILHAUD,G;VILDE,F;MARTIN,E; CALMETTES,C;ELHADAD,A;MERIENNE,L;TRINCHET,J.C. Ann.Méd.Interne (Paris).127,12,899-904,1976.
- 118.- DUNCAN,T;CARE,A.D. Br.J.Surg. 54,196-198,1967.
- 119.- EARLY,L.E;DAUGHARTY,T.M. N.Eng.J.Med. 281,72-88, 1969 .
- 120.- EDMAN,P;BEGG,G. Eur.J.Biochem. 1,80-91,1967.
- 121.- EGAN,M.L;COLIGAN,J.E;MORRIS,J.E;SCHNUTE,W.C; TODD,W. Proc.IX Intern.Cancer Congress.ICS. 349,244-248,1974.
- 122.- EKINS,R.P;SGHERZI,A.M. En:Radiochemical Methods of Analysis.Vol.II.Viena.I.A.E.A.1965.Pg.239.
- 123.- EKINS,R.P. En:Protein and Polypeptide Hormones. Ed.M.Margoulies.Excerpta Medica Found.Amsterdam. 1969.Pg.612.
- 124.- EKINS,R.P. En:Methods in Enzimology.O'Malley-Hardman Ed. Acad.Press.N.Y.1977.Pg.1-72.
- 125.-EPSTEIN,S;OWEN,G. South Afr.Med.J. 51,133-137,1977.
- 126.- ESBRIT,P;MATA,F. Rev.Ibérica de Endocrinología, 136,333-355,1976.
- 127.- FARRANT,P.C;INSLEY,J. Lancet,ii,434,1960..
- 128.- FEYRTER,F. Barth. Leipzig.1938.
- 129.- FEYRTER,F. Ergebn.Allgem.Path.Anat. 3,36,1943.
- 130.- FISHMAN,W.H;SINGER,R.M. Ann.N.Y.Acad.Sci. 259, 261-272,1975.
- 131.- FOSTER,G.V;BAGHDIAANTZ,A;KUMAR,M.A;SLACK,E;SOLIMAN, H.A;MAC INTYRE,I. Nature,202,1303-1305,1964.

- 132.- FOSTER,G.V;MACINTYRE,I;PEARSE,A.G.E. Nature,
203,1029-1030,1964.
- 133.- FOSTER,G.V;JOPLIN,G.F;MACINTYRE,I;MELVIN,K.E.W;
SLACK,E: Lancet,i,107,1966.
- 134.- FOSTER,G.V;BYFIELD,P.G.H;GUDMUNDSSON,T.V.
Clin.Endoc.Metab. 93-124,1972.
- 135.- FRANCHIMONT,P. La Sécrétion Normale et Patholo-
gique de la Somatotrophie et des Gonadotrophines
Humaines. Ed.Masson.Paris,1971.
- 136.- FRANCHIMONT,P;HEYENEN,G. En: Parathormone and
Calcitonin in Various Medical and Osteoarticular
Disorders. Ed.Masson,Paris,1976.
- 137.- FRIEDMAN,J;RAISZ,L.G. Science,150,1465,1965.
- 138.- FROLICH,M;KASENAAR,A.A.H;SMEENK,D. Horm.Metab.Res.
3,297-298,1971.
- 139.- GAILLARD,P.J. En: Proc.Koninklijke Nederlandse
Akademia van Wetenschappen:Series C. Biological
and Medical Sciences.Amsterdam.70,309-320,1967.
- 140.- GALANTE,L. En: Calcitonin 1969.Proc.2th Internat.
Symp. Taylor & Foster Ed.Heineman Medical.London.
Pg.427-433.
- 141.- GALANTE,L;COLSTON,K.W;MAC AULEY,S.J;MACINTYRE,I.
Nature, 238,271-273, 1972.
- 142.- GALTON,V.A;INGGAR,S.A;JIMENEZ-FONSECA,J.
J.Clin.Invest. 50,1345-1354,1971.
- 143.- GAUTVICK,K.M;NORMAN,T;TEIG,V;WILLW,S.O;BRENNHOVD,
I.O;CHRISTENSEN,I. Scand.J.Clin.Lab.Invest.
36,4,323-330,1976.
- 144.- GELLOTTE,B. J.Chromatog. 3,330,1960.
- 145.- GEWIRTZ,G;YALOW,R.S. Endocrinology.Suppl.A-53.
92,1973.
- 146.- GEWIRTZ,G;YALOW,R.S. J.Clin.Invest.53,1022-1032,
1974.
- 147.- GILLQUIST,J;LARSSON,J;SJODAHL,R. Scand.J.Gastroent.
12,21-25,1977.
- 148.- GITTLIN,D. Ann.N.Y.Acad.Sci.259,7-16,1975.

- 149.- GITTES,R.F;IRVIN,G.L. Endocrinology,79,1033-1039,1966.
- 150.- GITTES,R.F;TOVERUD,S.V;COOPER,C.W. Endocrinology, 82,83,1968.
- 151.- GODWIN,M.C. Am.J.Anat. 60,299,1937.
- 152.- GOLD,P;FREEDMAN,S. J.Exp.Med. 121,439-462,1965.
- 153.- GOLTZMAN,D. Clin.Res. 24,658 A,1976.
- 154.- GOLTZMAN,D;TISCHLER,A. J.Clin.Invest. 61,449-458, 1978.
- 155.- GOODFRIEND,T.L;LEVINE,L;FASMAN,G.D. Science, 144, 1344, 1964.
- 156.- GOODMAN,A.D;TANENBAUM,R;RABINOWITZ,D. J.Clin.Endoc.Metab. 35, 868, 1972.
- 157.- GORDAN,G.S;EISENBERG,E;LOKEN,H.F;GARDNER,B; HAYASHIDA,T. Rec.Prog.Horm.Res.18,297-336,1962.
- 158.- GORDAN,G.S;CANTINO,R.J;ERHARDT,L. Science,151, 1226-1228, 1966.
- 159.- GORDAN,G.S;ROOF,B.S. Ann.Intern.Med. 76-3,501-502, 1972.
- 160.- GORDEN,P;HENDRICKS,C.M;ROTH,J. J.Clin.Endoc.Metab. 36, 178, 1973.
- 161.- GOWENLOCK,A.H;PLATT,D.S;CAMPBELL,A.C.P;WORMSLEY,K. Lancet,i,304-306,1964.
- 162.- GRAY,T.K;MUNSON,P.L. Science,166, 512, 1969.
- 163.- GREENBERG,P.B;MARTIN,T.J;BECK,C. Cancer,30,75-79, 1972.
- 164.- GREENWOOD,F.C. En: Principles of Competitive Protein-Binding Assays. Odell & Daughaday Ed. J.B.Lippincott Co.Philadelphia & Toronto,1971.Pg.288.
- 165.- GREIL,A. En: Anatomische Hefte Arbeiten den Anatomische Institut von Wiesbaden. 29,455-506, 1905.
- 166.- GROSSMAN,M.I. Metabolism, 22, 1033, 1973.
- 167.- GRUMBACH,M.M;KAPLAN,S.L;SCIARRA,J.J;BURR,I.M. Ann. N. Y. Acad. Sci. 148, 501-531, 1968.

- 168.- GUTTMANN,S.T;PLESS,J;HUGUENIN,R.L;SANDRIN,E;
BOSSERT,H;ZEHNDER,K. En: Calcitonin 1969.
Proc. of the Second International Symposium.
Ed. Taylor & Heineman, 1970.Pag.74.
- 169.- HAAS,H.G;DAMBACHER,M. Lancet,ii,217-218,1968.
- 170.- HABENER,J.F;SINGER,F.R;DEFTOS,L.J;NEER,R.M;
POTTS,J.T,Jr. Nature New.Biol. 232,91-92,1971.
- 171.- HABENER,J.F;SINGER,F.R;DEFTOS,L.J;POTTS,J.T,Jr.
Endocrinology,90, 952-960, 1972.
- 172.- HABENER,J.F;DEFTOS,L.J;POTTS, J.T,Jr.
Clin. Chim. Acta. 39, 407-415, 1972.
- 173.- HABENER,J.F;POWELL,D;MURRAY,T.M;MAYER,G.P;
POTTS,J.T;Jr.Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 68,2986-
2991,1971.
- 174.- HABENER,J.F;MAYER,G.P;POWELL,D;MURRAY,T.M;
SINGER,F.R;POTTS,J.T,Jr. Clin. Chim. Acta.
45,225-233, 1973.
- 175.- HABER,E;PAGE,L.B;JACOBY,G.A. Biochem. N.Y.
4, 693, 1965.
- 176.- HADDAD,J.G,Jr;BIRGE,S.J;AVIOLI,L.V.
N.Eng.J.Med. 283, 549, 1970.
- 177.- HARGIS,G.K;WILLIAMS,G.A;REYNOLDS,W.A;CHERTON,B.S;
KUKREJA,S.C;BOWSER,E.N;HENDERSON,W.J.
Endocrinology,102,745-750, 1978.
- 178.- HARRIS,P.W.R;EL KATIB,M.B. Br.J.Surg. 55,472,1968.
- 179.- HATZFELD,A;WEBER,A;SCHAPIRA,F. Ann.N.Y.Acad.Sci.
259, 287-297, 1975.
- 180.- HAWKINS,F.G;RAPADO,A: Medicina Clínica,59,275-
279, 1972.
- 181.- HENNESSY,J.F;GRAY,T.K;COOPER,C.W;ONTJES,D.A.
J. Clin. Endoc. Metab. 36,200-203, 1973.
- 182.- HENNESSY,J.F;WELLS,S.A;ONTJES,D.A;COOPER,C.W.
J.Clin.Endoc.Metab. 39,487-495, 1974.
- 183.- HERBERT,V;LAU,K.S;GOTTLIEB,C.W;BLEICHER,S.J.
J.Clin.Endoc.Metab. 25, 1375, 1965.

- 184.- HERBERT,V: En:Protein and Polypeptide Hormones.
Ed.M.Margoulies.Excerpta Medica Found,1969.Pg.55.
- 185.- HERSCHMAN,J.M. Mayo Clin.Proc.47,913-918,1972.
- 186.- HESCH,R.D;HUFNER,M;PASCHEN,K;MUHLE,V.Z.
Deutsch.Med.Wschr. 96,764,1971.
- 187.- HESCH,R.D;HUFNER,M;HASENHAGER,B;CREUTZFELDT,W.
Horm. Metab. Res. 3, 140, 1971.
- 188.- HEYNEN,G;KANIS,J.A;EARNSHAW,M;RUSSE,R.G;WOODS,C.G.
Proc.Eur.Dialysis & Transplant Association.
Vol.13.Ed.Robinson,Vereerstraeten,Hawkins,1976.
Pag.403-408.
- 189.- HIGASHINO,K;TAKAHASI,Y;KANG,K.Y. Clin.Chim.Acta.
40, 67-82, 1972.
- 190.- HIGASHINO,K;KUDO,S;OHTANI,R;YAMAMURA,Y.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 259,337-346, 1975.
- 191.- HILLS,E.A. Br.J.Dis.Chest. 62, 88, 1968.
- 192.- HILLYARD,C.J;COOMBES,R.C;GREENBERG,P.B;MACINTYRE,
I. Calcif. Tis. Res. Suppl. 21,299,1976.
- 193.- HIMSWORTH,R.L;BLOOMFIELD,G.A;COOMBES,R.C;ELLISON,
M;GILKES,J.J.H;LOWRY,P.J;SETCHELL,K.R.D;SLAVIN,G;
REES,L.H. Clin. Endocrinol. 7, 45-62, 1977.
- 194.- HIRAI,H;ALPERT,E. Carcinofetal Proteins:BiologY
and Chemistry. Ann.N.Y.Acad.Sci.Vol.259,1975.
- 195.- HIRSCH,P.F;GAUTHIER,G.F;MUNSON,P.L.
Endocrinology, 73,244-252, 1963.
- 196.- HIRSCH,P.F;VOELKEL,E.F;MUNSON,P.L.
Science, 146, 412-413, 1964.
- 197.- HIRSCH,P.F;MUNSON,P.L. Physiological Reviews.
49,548-622,1969.
- 198.- HORNUM,I;FAHRENKRUG,J;REHFELD,J.F.
Calcif. Tis. Res. Suppl.21, 299, 1976.
- 199.- HOTZ,J;GOEBELL,H;ZIEGLER,R. Gut, 18,615-622,1977.
- 200.- HUNTER,W.M;GREENWOOD,F.C. Nature, 194,495-496,1962

- 201.- HUNTER,W.M. En: Radioimmunoassay Methods.
Ed.Kirkham & Hunter. Churchill Livingstone.
Edinburg & London,1971.Pg.3-23.
- 202.- IBANEZ,M.L;COLE,V.W;RUSSELL,W.O;CLARK,R.L.
Cancer, 20, 706-723, 1967.
- 203.- ICHIHARA,A. Ann.N.Y.Acad.Sci. 259,347-354,1975.
- 204.- ITO,H;SAKURADA,T;ORIMO,H. Horm.Metab.Res. 9,
89-92, 1977.
- 205.- JACOBS,H.S;LAWTON,N.F. Br.Med.Bull.30,55,1974.
- 206.- JESSIMAN,A.G;EMERSON,K;SHAH,R.C;MOORE,F.D.
Ann.Surgery. 157,377-393, 1963.
- 207.- JOHNSTON,C.C;DEISS,W.P,Jr. Endocrinology, 78,
1139-1143, 1966.
- 208.- JOWSEY,J;RIGGS,B.L;GOLDSMITH?r.S;KELLY,P.J;
ARNAUD,C.D. J.Clin.Endoc.Metab.33,752,1971.
- 209.- JULLIENNE.A;RAULAIS,D;CRESENT,M;MOUKITAR,M.S;
MILHAUD,G. C.R.Acad.Sci.Paris.Serie D.831-834,
1977.
- 210.- KANIS,J.A;EARNSHAW,M;HEYENEN,G;LEDINGHAM,J.G.G;
OLIVER,D;PRICE,C;RUSSELL,R.G.G;WOODS,C.G.
Proc.Eur.Dialysis ans Transplant Association.
Vol.13. Ed.Robinson,Vereestraeten,Hawkins,1976.
Pag.409-416.
- 211.- KAPLAN,E.W;SINGH,M;ARNAUD,C,D. Current Topics
Surg.Res. 2, 167-174,1970.
- 212.- KEMPER,B;HABENER,J.F;POTTS,J.T,Jr;RICH,A.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 69,3, 643-647, 1972.
- 213.- KAUTMAN,H.T;PARSONS,J.A;POTTS,J.T,Jr;SCHLUETER,
R.J. J.Biol.Chem. 245,6,1491-1496, 1970.
- 214.- KITHIER,K;LUSHER,J;BROUGHT,J;POULICK,M.D.
J.Pediatr. 81, 71-75, 1972.
- 215.- KLEIN,D.C;RAISZ,L.G. Endocrinology,86,1436-1440,
1970.
- 216.- KNILL JONES,R.P;BUCKLE,R.M;PARSONS,V;CALNE,R.Y;
WILLIAMS,R. N.Eng.J.Med. 282,704-708,1970.

- 217.- KOSAKI,G;YAMAMOTO,T. Ann.N.Y.Acad.Sci. 259,
366-376, 1975.
- 218.- KOSTKA,V;CARPENTIER,F.H. J.Biol.Chem. 239,
1799-1803,1964.
- 219.- KRUPPEY,J;GOLD,P;FREEDMAN,S. Nature,215,67-68,1967.
- 220.- LAFFERTY,F.W. Medicine (Baltimore), 45, 247-
260, 1966.
- 221.- LANNI,F;DILLON,M.L;BEARD,J.W. Proc.Soc.Exp.Biol.
Med. 74, 4-7, 1950.
- 222.- LATHE,G.H;RUTHVEN,C.R.J. Biochem.J. 62,
665-674, 1956.
- 223.- LAW,D.H;LIDDLE,G.W;SCOTT,H.W,Jr;TAUBER,S.D.
N.Eng.J.Med. 273, 292, 1965.
- 224.- LE DOURAIN,N;LE LIEVRE,C. C.R.Hebdomadaires
Acad.Sci.Paris.Series D.270,2857-2860,1970.
- 225.- LE DOURAIN,N;LE LIEVRE,C.;FONTAINE,J.
C.R.H.Acad.Sci.Paris-D- 275,583-586,1972.
- 226.- LE DOURAIN,N;TEILLET,M.A. J.Embryol.Exp.Morphol.
30, 31-48, 1973.
- 227.- LEE,M.R;DEFTOS,L.J;POTTS,J.T;Jr. Endocrinology,
84, 36-40, 1969.
- 228.- LEHMAN,F.G. Ann.N.Y.Acad.Sci.259,196-210,1975.
- 229.- LEHNINGER,A.L.En: Biochemistry,2th.Ed.Worth Pub.
Inc. 1975,pg.180.
- 230.- LEVINE,L;HINKLE,P.M;VOELKEL,E.F;TASHJIAN,A.H.
Biochem.Biophys.Res.Comm.47,888-896,1972.
- 231.- LEVINE,R.J;METZ,S.A. Ann.N.Y.Acad.Sci. 230,
533-546,1974.
- 232.- LEWIS,P;RAFFERTY,B;SCHELLEY,M;ROBINSON,C.J.
J.Endocr. 45,ix,1971.
- 233.- LIDDLE,G.W;ISLAND,D.P;NEY,R.L;NICHOLSON,W.E;
SHIMIZU,N. Arch.Intern.Med. 111,471,1963.
- 234.- LIDDLE,G.W;GIVENS,J.R;NICHOLSON,W.E;ISLAND,D.P.
Cancer.Res. 25, 1057, 1965.
- 235.- LORRAINE,J.A;BELL,E.T. Hormone Assays and theyr
Clinical Application.3rd Ed.Edinburg-Livingstone,
1971.

- 236.- LUICKX,A.S;LEFEVRE,P. Postgraduate Med.J.
49, 620, 1973.
- 237.- LYALL,S.S;MARIEB,N.J;WISE,J.K;CORNOG,J.L;
NEVILLE,E.L;FELIG,P. Arch.Intern.Med. 135,
865-867, 1975.
- 238.- MACFARLANE,A.S. Nature,182,53,1958.
- 239.- MACINTYRE,I. En: Calcitonin 1969.Proc.Second
International Symp.Taylor&Foster Ed.Heinemann
Medical.London,1970.Pg.1-13.
- 240.- MACMANUS,J.P;RIXON,R.H;BRACELAND,B.M;YOU DALE,T;
WITHFIELD,J.F.En: Endocrinology 1973.Taylor Ed.
Heinemann Medical.London,1974.
- 241.- MAIER,R;KAMBER,B;RINIKER,B;RITTEL,W.
Horm.Metab.Res. 7,511, 1975.
- 242.- MAIER,R. Calcif.Tis.Res.Suppl.21,317,1976.
- 243.- MANCHEÑO,E. Criterios de Validación del RIA.
Comunicación Personal.1978.
- 244.- MANN,D.L;GALLAGHER,N.I;DONATI,R.M. Ann.Intern.-
Med. 66,333-340,1967.
- 245.- MANSON,A.M;RATCLIFFE,J.G;BUCKLE,R.M.
Clin.Endocrinol. 1, 3-25, 1972.
- 246.- MARGOLIS,S;HOMCY,C. MEDICINE,51,381-391,1972.
- 247.- MARCK,G.R;ROBEY,D.R;KURMAN,R.J. J.Bone & Joint
Surgery, 59A,8,1107-1111,1977.
- 248.- MARX,S.J;AURBACH,G.D. Endocrinology,97,448,1975.
- 249.- MASOPUST,J;KITHIER,K;RADL,J;KOUTECKY,J;KOTAL,L.
Int.J.Cancer. 3,364-373,1968.
- 250.- MAWAS,C;KOHEN.M;LEMERLE,J;BUFFE,D;SCHWISGUTH,O;
BURTIN,P. Int.J.Cancer. 4,76-79,1969.
- 251.- MC CALLUM,W.G;VOEGTTLIN,C. J.Exper.Med. 11,118-
151, 1909.
- 252.- MC FADZEAN,A.J;YEUNG,R.T. Am.J.Med.47,220-235,
1969.
- 253.- MEARS,D.C. Endocrinology, 88,1021, 1971.
- 254.- MELANCON,M.J;DE LUCA,H.F. Endocrinology,85,
704-710, 1969.
- 255.- MELICK,R.A;MARTIN,T.J;HICKS,J.D. Br.Med.J. ii,
204-205,1972.

- 256.- MELMON,K.L;LOVENBERG,W;SJOERDSMA,A.
Clin.Chim.Acta. 12, 292, 1965.
- 257.- MELVIN,K.E.W;TASHJIAN,A.H,Jr;MILLER,H.
Rec.Prog.Horm.Res. 399-463,1972.
- 258.- MEYER,R.A;BRINKLEY,H.J. J.Pharmacol.Exptl.
Therap. 181, 171-175, 1975.
- 259.- MEYER,R.A;MEYER,M.H. Endocrinology,96,1048-1050,
1975.
- 260.- MILHAUD,G;LOB,J.C. Science, 154,794-795,1966.
- 261.- MILHAUD,G;CALMETTE,C;TABOULET,J;JULLIENNE,A;
MOUKHTAR,M.S. Lancet,i,462,1974.(Letter).
- 262.- MILHAUD,G;TALBOT,J.N;COUTRIS,G. Biomedicine,
23, 223, 1975.
- 263.- MILHAUD,G;RIBEIRO,F.M;CALMETTE,C;TABOULET,J;
COUTRIS,C;MOUKHTAR,M.S. Nouv.Pres.Med. 4,24,
1793-1795, 1975.
- 264.- MIYAJI,T. Cancer Res. 14, 179, 1973.
- 265.- MOORE,S;STEIN,W.H. J.Biol.Chem. 239,1799-1803,
1964.
- 266.- MORII,H;DE LUCA,H.F. Am.J.Physiol. 213,358-362,
1967.
- 267.- MOUKHTAR,M.S;TARAUD,D;JULLIENNE,A;RAULAIS,D;
CALMETTES,C;MILHAUD,G. Experientia,30,552-555,
1974.
- 268.- MOYA,F;NIETO,A;RODRIGUEZ-CANDELA,J.L.
Eur.J.Biochem. 55,407-413, 1975.
- 269.- MUGGIA,F.M;ROSEN,F.W;WEINTRAUB,B.D;HANSEN,H.H.
Cancer, 36, 1327-1337, 1975.
- 270.- MUNSON,P.L. En:Handbook of Physiology.Section 7.
Vol.VII. Chapter 20.pg.449.
- 271.- MURRAY,J.S;PATON,R.R;POPE,C.E. N.Eng.J.Med.
264,436,1961.
- 272.- NAKAYAMA,T;YOSHIDA,M;KITAMURA,M. Clin.Chim...
Acta. 30,546-548,1970.

- 273.- NEHER,V.R;RINIKER,B;RITTEL,W;ZUBER,H.
Helv.Chim.Acta. 51,8,1900-1906,1968.
- 274.- NELSON,D.H;SPRUNT,J.G;MIMS,R.B. J.Clin.Endocr.
26,722,1966.
- 275.- NEWSOME,F.E;O'DOR,R.K;PARKES,C.O;COPP,D.H.
Endocrinology,92,1102-1106,1973.
- 276.- NIALL,H.D. Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 771-778,1969.
- 277.- NIITSU,Y;KOHGO,Y;YOKOTA,M;URUSHIZAKI,I.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 259,450-452,1975.
- 278.- NISHI,S. Cancer Res. 30,2507-2513,1970.
- 279.- NONIDEZ,J.F. Am.J.Anat. 49,479-505,1932.
- 280.- NONIDEZ,J.F. Anat.Record. 53,339,1932.
- 281.- NONIDEZ,J.F. Anat.Record. 56,131-141,1933.
- 282.- OGATA,E;SHIMAZAWA,E;SUZUKI,H;YASHITASHI,P;
ASANO,H;ANDO,H. Endocrinology,87,421-426,1970.
- 283.- OLEFSKY,J;KEMPSON,R;JONES,H. N.Eng.J.Med.286,
740-745,1972.
- 284.- OOHAMA,T;SHIRAKI,M;ITO,H;TANAKA,K;ORIMO,H.
Endocrinol.Jap. 20, 625-627, 1973.
- 285.- ORTS LLORCA,F. En: Anatomía Humana, Segunda Ed.
Tomo III.Edit.Científico Médica,1962. Pg.343.
- 286.- OUZILOU,J;ROBERT,A.M;ROBERT,L;BOUISSOU,H;
PIERRAGI,M.T. Paroi Artérielle,1,105,1973.
- 287.- OYA,S;VAQUERO,J;LOPEZ,J.G. Phronesis,24,465-
478, 1976.
- 288.- OYA,S;VAQUERO,J. Arch.Fac.Med.Madrid. XXX,6,
361-372,1976.
- 289.- OYA,S;LOPEZ,J.G;VAQUERO,J;RAMIRO,M.J.
Arch.Fac.Med.Madrid. XXXIX,4,237-244,1976.
- 290.- OYA,S. Comunicación Personal,1977.
- 291.- PAILLARD,F;VERNEJOU,L,M.C;NIVEZ,M.P;MEYRIER,A;
ARDAILLOU,R. Horm.Metab.Res. 9,344-345,1977.
- 292.- PALOYAN,E;PALOYAN,D;HARPER,P.V. Metabolism,
16, 35-39, 1967.

- 293.- PALOYAN,E;PALOYAN,D;HARPER,P.V. Surgery,62,
167-173,1967.
- 294.- PARKINSON,D.K;RADDE,I.C. En: Calcitonin 1969.
Proc.Second Internat.Symp. Taylor & Foster Ed.
Heineman Medical,London 1970.Pg.466-471.
- 295.- PARSONS,J.A;REYNOLDS,J.J. Lancet,i,1067-1070,1968.
- 296.- PARSONS,J.A;NEER,R.M;POTTS,J.T,Jr.
Endocrinology,89,735,1971.
- 297.- PAULLADA,J.J;LISCI-GARMILLA,A;GONZALEZ ANGULO,E.
Am.J.Med. 48,990-999,1968.
- 298.- PEARSE,A.G.E;CARVALHEIRA,A.F. Nature,214,929,1967.
- 299.- PEARSE,A.G.E. J.Histochem.Cytochem. 17,303-313,
1969.
- 300.- PEARSE,A.G.E;POLACK,J. Hystochemie,27,96-102,1971.
- 301.- PEARSE,A.G.E;POLACK,J.M. Medical Biology,52,
3-18,1974.
- 302.- PENG,T.C;COOPER,C.W;PETRUSZ,P;VOLPERT,E.M.
Pharmacologist,16,276,1974.
- 303.- PICTET,R.L;RALL,L.B;PHELP,P;RUTTER,W. Science,
191, 191-192,1976.
- 304.- PLIMPTON,C.H;GELLHORN,A. Am.J.Med. 21,750-759,
1956.
- 305.- PORATH,J;FLODIN,P. Nature,183,1657,1959.
- 306.- POTTS,J.T,Jr. En: Calcitonin 1969.Proc.Second
Internat.Symp. Ed.Taylor & Foster. Heineman
Medical.London,1970.Pg.56-73.
- 307.- POTTS,J.T,Jr. En: Methods in Investigative and
Diagnostic Endocrinology.Non Pituitary Hormones.
Ed.Yalow & Berson,1973.Pg. 991-998.
- 308.- RACE,G.J;FINNEY,J.W;MALLAMS,J.T. J.A.M.A. 187,
150-151,1964.
- 309.- RADDE,I.C;WITTERMANN,E.R;PENSUWAN,S. Endocrino-
logy,83, 1285-1292, 1968.
- 310.- RADDE,I.C. En: Calcitonin 1969. Proc.Second.
Internat.Symp. Ed.Taylor & Foster. Heineman
Medical.London,1970,376-380.

- 311.- RAISZ, L.G; AU, W.Y.W; FRIEDMAN, J; NIEMANN, I.
Am.J.Med. 43, 684-690, 1967.
- 312.- RASMUSSEN, H; ANAST, C; ARNAUD, C. J.Clin.Invest.
46, 746-752, 1967.
- 313.- RASMUSSEN, H; BORDIER, P; KUROKAWA, K; NAGATA, N;
OGATA, E. Am.J.Med. 56, 751, 1974.
- 314.- RASMUSSEN, H. En: Williams' Textbook of Endocri-
nology. Fifth Ed. Saunders, 1974. Pg. 660-773.
- 315.- RATCLIFFE, J.G; SCOTT, A.P; BENNETT, H.P.
Clin.Endocrinol. 2, 51-55, 1973.
- 316.- REES, L.H; BLOOMFIELD, G.A; REESE, G.M.
J.Clin.Endoc.Metab. 38, 1090-1097, 1974.
- 317.- REYNOLDS, J.J; MINKIN, C; PARSONS, J.A.
Calcif.Tis.Res. 4, 350-358, 1970.
- 318.- ROBERT, A.M; GROSGOGEAT, Y; REVERDY, V; ROBERT, B;
ROBERT, L. Atherosclerosis, 13, 427, 1971.
- 319.- ROBERT, L; BRECHEIMER, D; GODEAU, G; LABAT, M.L;
MILHAUD, G. Biochemical Pharmacology. 26, 2129-
2135, 1977.
- 320.- ROBERTSON, D.R. En: Calcitonin 1969. Proc. Second
Internat.Symp.Taylor & Foster Ed. Heyneman Med.
London, 1970. Pg. 311-319.
- 321.- ROBINSON, C.J; MARTIN, T.J; MATTEWS, E.W; MACINTYRE, I.
J.Endocr. 39, 71, 1967.
- 322.- ROBINSON, C.J; MARTIN, T.J; MACINTYRE, I. Lancet, ii,
83-84, 1966.
- 323.- RODBARD, D; RAYFORD, P.L; ROSS, G.T. J.Clin.Endoc...
Metab. 29, 352, 1968.
- 324.- RODBARD, D; FRAZIER, G.R. En: Methods In Enzymology.
XXXVII-Hormone Action. Part B. Ed. O'Malley-Hardman.
Acad.Press. N.Y. 1975. Pg. 3-38.
- 325.- ROITT, I.M; GREAVES, M.F; TORRINGAN, G; BROSTOFF, J;
PLAYFAIR, J.H.L. Lancet, ii, 367, 1969.
- 326.- ROOS, B.A; OKANO, K; DEFTOS, L.J. Biochem.Biophys...
Res.Comm. 60, 3, 1134-1140, 1974.

- 327.- ROOS,B.A;DEFTOS,L.J. Clin.Endoc.5,Suppl.,
217-222,1976.
- 328.- ROSEN,S.W;BECKER,C.E;SCHLAFF,S.
N.Eng.J.Med. 279,640-641,1968.
- 329.- ROSEN,S.W;WEINTRAUB,B.D;VAITUKAITIS,J.L;
SUSSMAN,H.H;HERTSCHMAN,J.M;MUGGIA,F.M.
Ann. Intern.Med. 82,71-83, 1975.
- 330.- ROTH,S.I. Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 68,138,1968.
- 331.- SAKURAI,M;MIYAJI,T. Ann.N.Y.Acad.Sci. 259,
156-167,1975.
- 332.- SALASSA,R.M;JOWSEY,J;ARNAUD,C.D.
N.Eng.J.Med. 283,65-70,1970.
- 333.- SAMMON,P.J;BRAND,J.S;NEUMAN,W.F;RAISZ,L.G.
Endocrinology, 92,1595-1603,1973.
- 334.- SANDLER,M;SNOW,P.J.D. Lancet,i,137,1958.
- 335.- SATO,K;SATO,T;MORRIS,H.P;WEINHOUSE,S.
Proc.3th Intern.Conf. on Isozymes. April,18-20,
1974. Yale Univ. N.Haven,Conn. 1975.
- 336.- SATO,K;SATO,T;MORRIS,H.P;WEINHOUSE,S.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 259, 273-286, 1975.
- 337.- SCARPACE,P.J;NEUMAN,W.F;RAISZ,L.G. Endocrino-
logy, 100, 1260-1267,1977.
- 338.- SCARPACE,P.J;DEFTOS,L.J. Endocrinology,101,
1398-1405,1977.
- 339.- SCHIMKE,R.N;HARTMANN,W.H;PROUT,T.E;RIMOIN,D.L.
N.Eng.J.Med. 279,1-7,1968.
- 340.- SCHNEIDER,B;GEWIRTZ,G;KRIEGER,D;YALOW,R.S.
Endocrinology,Suppl. A-53,92,1973.
- 341.- SCHWARTZ,W.B;BENNETT,W;CURELOP,S;BARTTER,F.C.
Am.J.Med. 23, 529, 1957.
- 342.- SCHWARTZ,W.B;TASSEL,D;BARTTER,F.C. N.Eng.J.Med.
262, 743, 1960.
- 343.- SELKURT,E.E. Physiology, 4th Ed.Little,Brown
& Co. Boston,1976.Pg.595.
- 344.- SEPPALA,M. Ann. N.Y. Acad. Sci.259,59-73,1975.
- 345.- SHAMES,J.M;DHURANDHAR,N.R;BLACKARD,W.G.
Am.J.Med. 44, 632, 1968.

- 346.- SHERWOOD,L.M;O'RIORDAN,J.L.H;AURBACH,G.D;
POTTS,J.T,Jr. J.Clin.Endocr.Metab. 27, 140-146,
1967.
- 347.- SHERWOOD,L.M;HANDWERGER,S;McLAURIN,W.D;LANNER,M.
Nature, 233,59-61, 1971.
- 348.- SHERWOOD,L.M. Ectopic Hormone Syndromes,en:
Year Book of Endocrinology. S.H.Ingbar Ed.
Plenum Med.Book.N.Y. & London,1976.Pg.249-276.
- 349.- SIEBER,P;BRUGGER,M;KAMBER,B;RINIKER,B;RITTEL,W;
MAIER,R;STAEHELEIN,M. En: Calcitonin 1969. Proc.
Second Intern.Symp. Ed.Taylor. Heineman Medical.
London,1970.Pg.28.
- 350.- SILVA,O.L;BECKER,K.L;PRIMACK,A;DOPPMAN,J.L;
SNIDER,R.H. N.Eng.J.Med. 290,1122-1124,1974.
- 351.- SILVA,O.L;SNIDER,R.H;BECKER,K.L.
Clin.Chem. 20,337-339, 1974.
- 352.- SILVA,O.L;SNIDER,R.H;BECKER,K.L;MOORE,C.F.
Lancet,i,49-50,1975.
- 353.- SILVA,O.L;BECKER,K.L;PRIMACK,A;DOPPMAN,J;SNIDER,
R.H. J.A.M.A, 234,183,1975.
- 354.- SILVA,O.L;BECKER,K.L;PRIMACK,A;DOPPMAN,J.L;
SNIDER,R.H. Chest,69,495-499,1976.
- 355.- SILVA,O.L;SNIDER,R.H;BECKER,K.L;MOORE,C.F.
J.Endocrinol. 73,183-184,1977.
- 356.- SILVERMAN,R;YALOW,R.S. J.Clin.Invest. 52,
1950-1971,1973.
- 357.- SINGER,F.R;HABENER,J.F. Biochem.Biophys.Res...
Comm. 61,710-716,1974.
- 358.- SIZEMORE,G.W; GO,V.L.W;KAPLAN,E.L;SANZENBACHER,
L.T;HOLTERMULLER,K.H;ARNAUD,C.D.
N.Eng.J.Med. 288,641-644,1973.
- 359.- SIZEMORE,G.W;HEATH III,H;LARSON,J.M.
J.Clin.Invest. 55,1111-1118,1975.
- 360.- SJOGREN,H.O;STEELE,G. Ann.N.Y.Acad.Sci.
259,404-411,1975.

- 361.- SNIDER,R.H;SILVA,O.L;MOORE,C.F;BECKER,K.L.
Clin.Chim.Acta. 76, 1-14, 1977.
- 362.- SOLCIA,E;CAPELLA,C;VASALLO,G. Histochemie,
20,116-126,1969.
- 363.- SOLIMAN,H.A.A. Ph.D.Thesis.Univ. of London,1966.
- 364.- SØRENSEN,D.M;HINDBERG,I. Acta Endocrinol. 68,
585-596,1971.
- 365.- STANBURY,S.W. Clin.Endocrinol. 1,239-266,1972.
- 366.- STEEL,K;BAERG,R.D;ADAMS,D.O. J.Clin.Endoc. &
Metab. 27,1285-1289,1967.
- 367.- STEINER,H;DAHLBACK,O;WALDENSTROM,J. Lancet,i,
783-785,1968.
- 368.- STEINER,D.F;CUNNINGHAM,D;SPIGELMAN,L;ATEN,B.
Science, 157, 697, 1967.
- 369.- STEINETZ,B.G;MATTEWS,J.R;BUTLER,M.C.
Am.J.Pathol. 73, 735-746, 1973.
- 370.- STOLBACH,L.L;FISHMAN,W.H;KRANT,M.J.
N.Eng.J.Med. 281,757-762,1967.
- 371.- STROTT,C.A;NUGENT,C.A;TYLER,F.H.
Am.J.Med. 44, 97-104, 1968.
- 372.- STURTRIDGW,W.C;KUMAR,M.A. J.Endocrinol. 42,
501-503,1968.
- 373.- SUSSMAN,H.H;WEINTRAUB,B.D;ROSEN,S.W.
Cancer,33, 820-823, 1974.
- 374.- SUTHERLAND,E.W;DeDUVE,C. J.Biol.Chem. 175,
663,1948.
- 375.- SYNGE,R.L.M;TISELIUS,A. Biochem.J.46,XLi,1950.
- 376.- TALAMO,R.C;AUSTEN,K.F;HABER,E. En: Protein and
Polypeptide Hormones. Proc.Intern.Symp. Liege.
Part I.Ed.M.Margoulies.Amsterdam.Excerpta Med.
Found. 1968.Pg.93.
- 377.- TALJEDAL,I.B;WOLD,S. Biochem.J. 119,139,1970.
- 378.- TALMAGE,R.V;KENNEDY III,J.W. Endocrinology,
84,1026-1031,1969.

- 379.- TALMAGE,R.V;KENNEDY III,J.W. Endocrinology, 86,1075-1079,1970.
- 380.- TALMAGE,R.V;DOPPELT,S.H;POSTMA,J.H. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 153,131-137,1976.
- 381.- TAMARIT,J.Primer Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas.Mesa Redonda de Radioinmunoensayo.Zaragoza-1975.Pg.87-98.
- 382.- TANZER,F.S;KENNEDY III,J.W. Proc.Soc.Exp.Biol.. Med. 133,500-505,1970.
- 383.- TASHJIAN,A.H;MUNSON,P.L.Endocrinology,77,520-528,1965.
- 384.- TASHJIAN,A.H: Endocrinology,77,375-381,1965.
- 385.- TASHJIAN,A.H;WARNOCK,D.R. Endocrinology,81, 306-318,1967.
- 386.- TASHJIAN,A.H;VOELKEL,E.F;LEVINE,L;GOLDHABER,P. J.Exp.Med. 136,1329-1343,1972.
- 387.- TASHJIAN,A.H. En:Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology.Non Pituitary Hormones. Ed.Yalow & Berson.1973.Pg.1010-1019.
- 388.- THOMSON,J.S;PALMIERI,G.M.A;ELIEL,L.P;CUTLER,G.A. Endocrinology,83,470-474,1968.
- 389.- THOMSON,J.S,URIST,M.R. Clin.Ortopaed. 90, 201-208,1973.
- 390.- TSUIKI,S;MIYAJI,T. Ann.N.Y.Acad.Sci.259,347-354,1975.
- 391.- TURKINGTON,R.W. N.Eng.J.Med.285,1455-1458,1971.
- 392.- TURNER,D.S;MARKS,V. Lancet,i,1095-1097,1972.
- 393.- TURNER-WARWICK,R.T. Lancet,ii,546-547,1956.
- 394.- UPTON,G.V;AMATRUDA,T.T,Jr. N.Eng.J.Med. 285, 419-424,1971.
- 395.- URIEL,J;DE NECHAUD,B;STANISLAWSKI -BIRENCWAJG,M; MASSEYEFF,R;LEBLANC,L;QUENUM,C. C.R.H.Acad.Sci. Paris,265,75-78,1967.

- 396.- VAITUKAITIS, J; ROBBINS, J. B; NIESCHLAG, E; ROSE, G. T.
J. Clin. Endoc. 33, 988-991, 1971.
- 397.- VANCE, J. E; KITABCHI, A. E; BUCHANAN, K. D; STOLL, R. W;
HOLLANDER, D; WOOD, F. C. Diabetes, 17, 299, 1968.
- 398.- VAN DEN BERG, A. R; VASU, C. M. J. A. M. A, 185, 249-
251, 1963.
- 399.- VAN DER SLUYS VEER, J; CHOUFOER, J. C; QUERIDO, A;
VAN DER HEUL, R. O; HOLLANDER, C. F; VAN RIJSSEL, T. G.
Lancet, i, 1416, 1964.
- 400.- VOELKEL, E. F; TASHJIAN, A. H; DAVIDOFF, F. F; COHEN, R. B;
PERLIA, C. P; WURTMAN, R. J. J. Clin. Endoc. Metab.
37, 297-307, 1973.
- 401.- WALLACH, S; CHAUSMER, A; MITTELMAN, R; DIMICH, A.
Endocrinology, 80, 61-64, 1967.
- 402.- WARNER, T. F. Lancet, i, 1259-1260, 1974.
- 403.- WASE, A. W; SOLEWSKI, J; RICKES, E; SEIDENBERG, J.
Nature, 214, 388-389, 1967.
- 404.- WATMAN, R. N; NASSET, E. S. Am. J. Physiol. 157,
216-220, 1949.
- 405.- WEICHERT, R. F; REED, R; CREECH, O. Ann. Surg. 165,
660, 1967.
- 406.- WEICHERT, R. Am. J. Med. 49, 232-241, 1970.
- 407.- WELLS, S. A; COOPER, C. W; ONTJES, D. A. Metabolism,
24, 1215-1219, 1975.
- 408.- WELSCH, U; FLITNEY, F. W; PEARSE, A. G. E. En: Calcitonin. Proc. Intern. Symp. Thyrocalcitonin and the C Cells. Ed. Taylor. Heineman Medical. London, 1968. Pg. 167-179.
- 409.- WEST, T. E. T; O'RIORDAN, J. L. H; CARE, A. D.
J. Endocrinol. 45, 495-504, 1969.
- 410.- WILLIAMS, E. D; CELESTIN, L. R. Thorax, 17, 120, 1962.
- 411.- WILLIAMS, C. C. Clinical Science, 1972.
- 412.- WILSON, D; SCARFATY, G; CLARRIS, B; DOUGLAS, M;
CRAWSHAW, K. Steroids, 18, 77, 1971.
- 413.- WOODHOUSE, N. J. Y. Clin. Endoc. Metab. 1972. Pg. 125.

- 414.- WOODHOUSE, N. J. Y; HOARE, A; MOHAMEDALLY, S. M; MARDSEN, P
Horm. Res. 7, 238-246, 1976.
- 415.- YALOW, R. S; BERSON, S. A. Nature, 184, 1648, 1959.
- 416.- YALOW, R. S; BERSON, S. A. En: Protein and Polypeptide Hormones. Ed. M. Margoulies. Excerpta Medica Found. Amsterdam, 1969. Pg. 71-76.
- 417.- YALOW, R. S. En mismo libro que cita 416. Pg. 627-650.
- 418.- YALOW, R. S; BERSON, S. A. En: Proc. Symposium on "in vitro" procedures with Radioisotopes in Clinical Medicine and Research; Viena, 1969. IAEA-SM-124/106. Pg. 455.
- 419.- YALOW, R. S; BERSON, S. A. En: Principles of Competitive Protein-Binding Assays. Ed. Odell & Daughaday. J. B. Lippincott Co. Philadelphia & Toronto. 1971. Pg. 1-21.
- 420.- YALOW, R. S; BERSON, S. A. Gastroenterology, 60, 203-214, 1971.
- 421.- YALOW, R. S; BERSON, S. A. Biochem. Biophys. Res. Comm. 44, 439, 1971.
- 422.- YALOW, R. S; BERSON, S. A. Biochem. Biophys. Res. Comm. 48, 391, 1972.
- 423.- YALOW, R. S; BERSON, S. A. Metab. Clin. Exp. 22, 703, 1973.
- 424.- YALOW, R. S; BERSON, S. A. Gastroenterology, 65, 19, 1973.
- 425.- YALOW, R. S; BERSON, S. A. En: Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology. Berson & Yalow Ed. Vol. 2-A. North Holland Publ. Co. Amsterdam, 1973. Pg. 155-167.
- 426.- YALOW, R. S. Rec. Prog. Horm. Res. 597-633, 1974.
- 427.- YALOW, R. S; BERSON, S. A. J. Clin. Endoc. Metab. 36, 415-423, 1973.
- 428.- YAMAJI, T; PECKHAM, W. D; ATKINSON, L. E; DIERSCHKE, D. T; KNOBIL, E. Endocrinology, 92, 1652-1659, 1973.

- 429.- YOUNG,D.M;CAPEN,C.C;BLACK,H.E. Endocrinology,
90,276-280,1972.
- 430.-- ZETTNER,A. Clin.Chem. 19,699-705,1973.
- 431.- ZETTNET,A;DULY,P. Clin.Chem. 20,5-14,1974.
- 432.- ZOLLINGER,R.M;ELLIOTT,D.W. Gastroenterology,
37,401,1959.

INDICE.

	Página
I. Introducción.....	4
I.a. Calcitonina Humana (HCT).....	4
I.a.1. Descubrimiento de la CT.....	4
I.a.2. Origen y Embriología de las células productoras de CT....	5
I.a.3. Extracción, Purificación y Caracterización de la CT....	10
Secuencia de aminoácidos de algunas Calcitoninas.....	15
I.a.4. Relación entre estructura y actividad biológica.....	16
I.a.5. Fisiología de la CT.....	16
Acciones sobre el Hueso	17
Acciones en el Riñón	18
Acciones sobre Estómago.....	19
Acciones sobre Páncreas	20
Acciones sobre Hígado	20
CT y metabolismo de la Glucosa	21
Otros efectos de la CT	21
Metabolización y duración de la acción de la CT	21
Interacciones de la CT con la Corteza Suprarrenal	22
Interacciones con Hormonas Sexuales	22
Interacciones con otras Hormonas Tiroideas	23
Interacciones con Metabolitos de la Vitamina D	23
Relaciones con la Hipófisis..	23
Mecanismo de acción	24
I.a.6. Factores que influyen en la secreción de Calcitonina	25
Pruebas de estimulación	28
I.a.7. Papel fisiológico de la CT ..	28
I.a.8. Aplicaciones diagnósticas de la determinación de HCT ..	29
I.a.9. Calcitonina y enfermedades no tiroideas	30
I.a.10 Aplicaciones terapéuticas ...	31
I.b. Métodos para la determinación de Calcitonina	34
I.b.1. Bioensayos	34
I.b.2. Radioinmunoanálisis (RIA)....	35
I.b.2a. Antígeno frío	36
I.b.2b. Antígeno marcado	36
I.b.2c. Anticuerpos	40

	Página
I.b.2d. Condiciones del ensayo ...	41
I.b.2e. Métodos para separar las fracciones libre y combinada con el AB	42
I.b.2f. Criterios de validación del RIA	43
I.b.2g. Métodos matemáticos de aplicación al RIA	49
I.c. Síndromes endocrinos asociados	
a Neoplasias	51
I.c.1. Síndrome de Cushing	58
I.c.2. Hipertiroidismo	59
I.c.3. Secreción inadecuada de ADH	59
I.c.4. Hipoglucemia y tumores no pancreáticos	60
I.c.5. Tumores productores de gonadotropinas	61
I.c.6. STH y tumores no hipofisa- rios	61
I.c.7. Secreción inadecuada de Eritropoyetina	61
I.c.8. Osteomalacia Hipofosfatémica Paraneoplásica	61
I.c.9. Lactógeno Placentario	62
I.c.10 Tumores elaboradores de Renina	62
I.c.11 Prolactina	62
I.c.12 Producción tumoral no para- tiroidea de PTH	62
I.c.13 Prostaglandinas	64
I.c.14 Producción tumoral de Proteínas No Hormonales	65
Alfa feto proteína	65
Fosfatasa alcalina placent..	66
Glucógeno Fosforilasa, etc...	67
Antígeno Carcinoembriónico .	67
Alfa-2-H-Globulina	68
Isoferritina y Ferritina ...	68
I.d. Calcitonina en tumores no tiroideos	69
I.e. Heterogeneidad de Hormonas Peptídicas	70
I.f. Heterogeneidad de Calcitonina	73
II. Propósitos	76
III. Pacientes, Material y Métodos.....	77
III.a. Material	78
III.b. Métodos	80
1.- RIA de HCT	81
Iodación de HCT	81
Incorporación Isotópica	82
Purificación de la Hormona Marcada	83

Cromatoelectroforesis	84
Cromatografía en capa fina	85
Especificidad y Titulación de los AB	85
Incubación del ensayo	86
Sepración de las fracciones libre y ligada al AB	87
Métodos Matemáticos	88
III.b.2. Fraccionamientos en Sephadex	90
III.b.3. Tratamiento con Urea 8M	94
III.b.4. Tratamiento con 2-ME 3M	95
III.b.5. Calibrado de la columna de Cromatografía	95
III.b.6. Parámetros Complementarios .	96
III.b.7. HCT basal en controles	96
III.b.8. Pacientes	97
III.b.9. Pruebas de Estimulación	98
Distribución de las Neo- plasias en las que se deter- minó Calcitonina	99
IV. Resultados	120
IV.1. RIA de HCT	121
IV.1a. Marcaje de HCT	121
IV.1b. Cromatoelectroforesis	123
IV.1c. Albúmina en el eluyente	123
IV.1d. Cromatografía en capa fina ...	123
IV.1e. AB anti-HCT	124
IV.1f. Incubación del ensayo	124
IV.1g. Estabilidad del trazador	124
IV.1h. Separación de las fracciones libre y ligada	124
IV.1i. Curvas Estandar	125
IV.1j. Reproducibilidad intra- análisis para Curvas Estandar	128
IV.1k. Paralelismo Buffer-Suero libre de HCT	128
IV.1l. Paralelismo entre diluciones .	128
IV.1m. Recuperación de Hormona fria .	129
IV.1n. Reproducibilidad intra- análisis para sueros	130
IV.1ñ. Reproducibilidad inter- análisis para sueros	131
IV.2. Niveles basales normales de HCT	132
IV.3. Calibrado de la Columna de Cromatografía	155
IV.4. Niveles basales de HCT en dife- rentes procesos neoformativos .	156
1.- Neoplasias Gástricas	156
2.- Neoplasias de Bronquio	157
Inyección de Pentagastrina en pacientes con Ca. de bronquio	159

3. Neoplasias Tiroideas	177
Carcinomas Tiroideos	
No Medulares	177
Inyección de Pentagastrina	
en pacientes con Ca.Tiroideos	
no medulares	177
Carcinomas Medulares	178
Infusión de Calcio	179
Inyección de Pentagastrina .	180
Heterogeneidad	181
4. Mielomas	222
5. Neoplasias Hepáticas	222
Fraccionamientos en Sephadex	223
6. Neoplasias de Próstata	227
7. Neoplasias de Riñón	227
Fraccionamientos en Sephadex	228
8. Neoplasias de Mama	232
9. Neoplasias de Colon	232
10. Neoplasias de Páncreas	233
11. Neoplasias de Utero	233
12. Neoplasias de Laringe	238
13. Neoplasias de Faringe	238
14. Neoplasias de Ovario	238
15. Neoplasias de Esófago	239
16. Neoplasias Suprarrenales ...	239
17. Neoplasias Cerebrales	240
18. Neoplasias Oseas	240
19. Neoplasias de Adenohipófisis	241
20. Neoplasias Pleurales	241
21. Neoplasias derivadas de la	
Grasa Retroperitoneal	241
V. Discusión	242
V.a.RIA de HCT	243
V.b.Niveles basales de HCT	253
V.c.HCT en Neoplasias Tiroideas	254
V.d.HCT en Neoplasias No Tiroideas .	262
VI. Conclusiones	269
VII. Bibliografía	273